

新規血小板凝集因子 Aggrus と癌転移

藤田直也, 加藤幸成, 鶴尾 隆

一般に高転移性癌細胞は高い血小板凝集活性をもつ。こうした血小板凝集は血行性転移における腫瘍塊の形成・腫瘍塞栓の形成に関与する。マウス高転移細胞株より同定された Aggrus は、細胞膜表面に発現している約 44 kD の糖タンパク質である。機能部位解析により、血小板凝集には付加されている糖鎖が重要であること、また血小板凝集活性にかかわる糖鎖付加部位 (PLAG domain) も同定されている。大腸癌や精巣腫瘍のセミノーマなどのヒト腫瘍でも、Aggrus 発現が亢進していることが明らかになってきており、今後の癌転移治療法開発の際の分子標的として有望な分子であると考えられる。

キーワード ● Aggrus, 癌転移, 血小板凝集, 抗体, 大腸癌, 精巣腫瘍

はじめに

悪性腫瘍は無秩序な増殖を特徴とした疾患である。しかし、悪性腫瘍の致死率を規定する最も大きな要因は、腫瘍の発生した原発巣における増殖ではなく、癌転移である。転移性癌細胞は異常な運動能・接着能・細胞外基質の破壊能などさまざまな性質を兼ね備えており、これは原発巣における宿主からの選択を受けて形成されたものである。このようにして形成された転移性癌細胞が転移巣を形成する臓器を選択する機構として、anatomical mechanical 説と seed and soil 説が提唱されている。前者の説は、原発巣から遊離した癌細胞が脈管内に侵入した後、最初に出会った臓器の毛細血管に機械的にトラップされ転移巣を形成するといった説である。

一方、転移は解剖学的につながりのある臓器だけでなく、それよりも遠方の臓器へも転移巣を生じる。その標的臓器はランダムではなく、原発巣の癌がどういった種類のものであるかによってある一定の傾向を示す。seed and soil 説はこのような転移を説明するための

仮説であり、これは seed となる癌細胞が原発巣から遊離し、soil となる転移先臓器の微小環境と適合するときのみそこに転移巣を形成するという仮説である。つまり soil となる転移先臓器からの増殖因子・接着分子などが seed となる癌細胞の定着・生存・浸潤・増殖に影響を与えるという考え方である。本稿では、前者の anatomical mechanical 説に沿った癌転移にかかわると考えられる、新規血小板凝集促進因子 Aggrus の癌転移促進機構を中心に、血小板凝集と癌転移について概説したい。

1 癌転移における血小板凝集の役割

① 癌転移にかかわる分子機構

癌が転移巣を形成するためには、①原発巣からの離脱と周辺組織への浸潤、②血管やリンパ管などの脈管系への侵入、③脈管系内での移動と免疫担当細胞との相互作用、④転移先臓器内の脈管への着床・塞栓形成、⑤脈管外への移動、⑥転移先臓器組織内への浸潤と増殖、といったさまざまなステップを経なければな

Induction of tumor metastasis by a novel platelet aggregation-inducing factor Aggrus

Naoya Fujita/Yukinari Kato/Takashi Tsuruo : Division of Cell Growth and Regulation, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo (東京大学分子細胞生物学研究所細胞増殖研究分野)

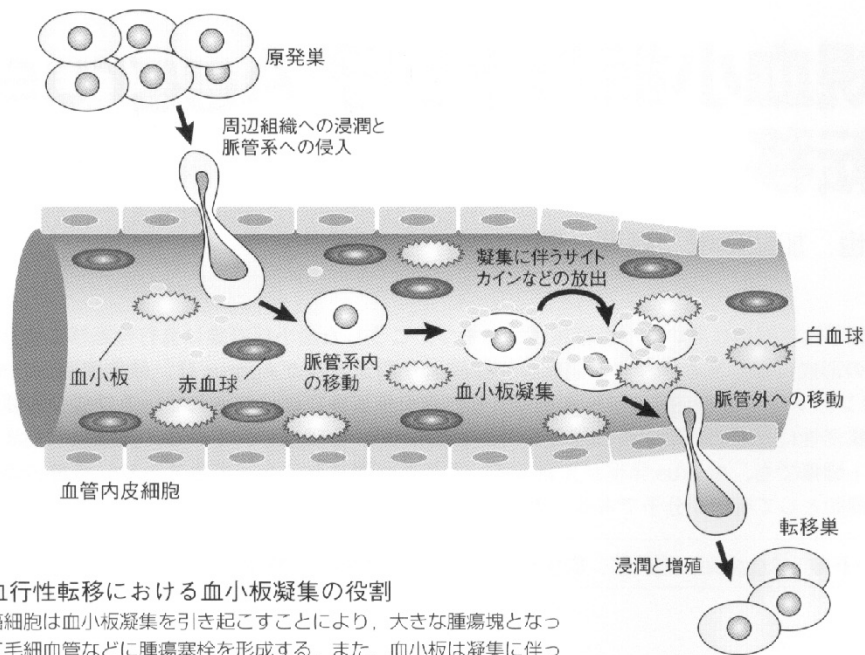


図1 血行性転移における血小板凝集の役割

癌細胞は血小板凝集を引き起こすことにより、大きな腫瘍塊となって毛細血管などに腫瘍塞栓を形成する。また、血小板は凝集に伴ってサイトカインやさまざまな生理活性物質を放出し、血管内皮細胞への接着亢進や癌細胞自身の増殖・生存を促進する

らない。例えば、①に際しては、癌細胞同士の接着に関与するE-カドヘリンの発現減少が関与すると報告されており、①、②、⑥には、癌細胞自身または周囲の間質細胞が産生するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP: matrix metallo protease) などのプロテアーゼによる細胞外マトリックスの分解が関与するとされ、④に関しては、癌細胞上のシアリルLe^a、シアリルLe^x、インテグリンファミリーの接着分子が、血管内皮細胞上のE-セレクチンや免疫グロブリンスーパーファミリーと相互作用することが転移形成に寄与するとされている。転移形成にかかわる複雑な過程を細分化して解析できる分子生物学的解析手法や *in vitro* モデルが近年開発され、おのおののステップに関与する転移関連遺伝子の同定やそれら分子間の相互作用が徐々に明らかとなってきている。

② 癌転移と血小板凝集

癌細胞は脈管系へ侵入した後、先に③で示したように免疫にかかわるさまざまな細胞と相互作用する。血小板も癌細胞と相互作用するが、一般に高転移性癌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することにより転移形成を助長するとされる(図1)¹⁾。血小板は凝集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さまざまな生理活性物質を放出し、癌細胞の血管内皮細胞への接着や癌細胞自身の生存促進にもかかわる。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あげられており、血小板凝集は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。

2 新規血小板凝集因子 Aggrus の同定とその機能部位解析

① 高転移性癌細胞に認められる血小板凝集誘導活性

われわれはマウス結腸癌細胞株 colon adenocarcinoma 26 を繰り返し実験的肺転移させることにより、高転移性株である NL-17 細胞と低転移性株である NL-14 細胞を取得した²⁾。これら細胞株の血小板凝集誘導活性をマウスの platelet-rich plasma^{※1)} (PRP) を用いて *in vitro* で比較すると、NL-17 細胞は血小板

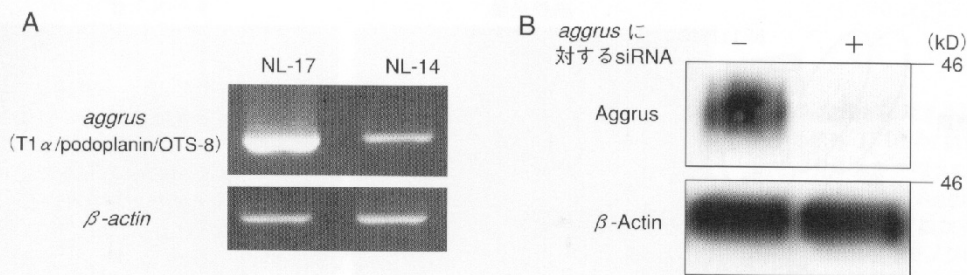


図2 新規血小板凝集因子 Aggrus の同定

A) 高転移性 NL-17 細胞と低転移性 NL-14 細胞より mRNA を調製し、T1 α /podoplanin/OTS-8 遺伝子を増幅できるプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、転移能に相関して T1 α /podoplanin/OTS-8 遺伝子 (= *aggrus* 遺伝子) の発現亢進が認められた。B) T1 α /podoplanin/OTS-8 遺伝子 (= *aggrus* 遺伝子) に対する siRNA をデザインし、NL-17 細胞に導入した。8F11 抗体により認識される抗原の発現が減少していることが確認され、Aggrus は T1 α /podoplanin/OTS-8 などさまざまな名前で報告されている分子と同一であることが確認された (文献 6 より改変、引用)

凝集誘導活性が高いが NL-14 細胞では低く、血小板凝集活性と転移能に相関が認められた。さらに、NL-17 細胞依存的な血小板凝集は血清成分を除去した血小板 (washed platelet) でも認められたことから、NL-17 細胞膜表面上には直接的に血小板と相互作用し凝集を引き起こす未知の分子が発現しているが、低転移性の NL-14 細胞ではその発現量が少ない可能性が示唆された。NL-17 細胞をラットに免疫することにより得られたモノクローナル抗体 8F11 は、44 kD の膜タンパク質 (gp44 と初期の頃の論文には記載していたが、遺伝子同定後に Aggrus と命名) を認識していたが、この抗体は NL-17 細胞依存的な血小板凝集を阻害する中和活性をもつことが見出された³⁾。さらに、NL-17 細胞の実験的肺転移を抑制する中和活性をもっていることを見出した⁴⁾。精製した Aggrus にも血小板凝集を誘導する活性が認められるだけでなく、精製 Aggrus 依存的な血小板凝集も 8F11 抗体の濃度依存的に抑制された⁵⁾。さまざまな酵素処理により、Aggrus には O-結合型の糖鎖が多く付加されており、特に付加さ

れているシアル酸が NL-17 による血小板凝集や NL-17 の肺への転移に重要な役割をしていることも示唆されていた⁵⁾。

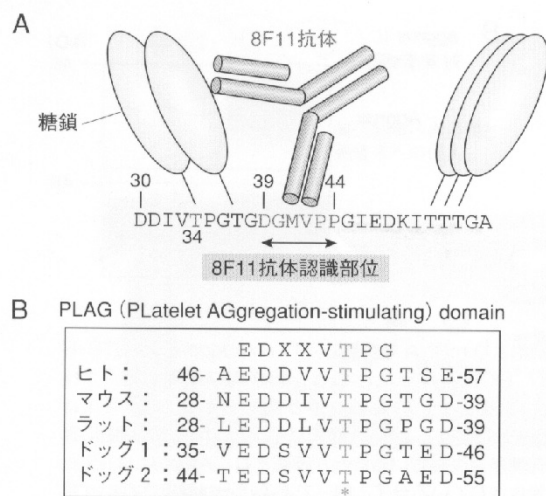
② 高転移性癌細胞膜表面に発現している血小板凝集因子 Aggrus の同定

われわれは 8F11 抗体を用いて、マウスの各種臓器や細胞株における Aggrus の発現分布を検討することにより、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 や肺組織に多量の Aggrus が発現していることを見出した⁶⁾。その性状は、MC3T3-E1 細胞に TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate) を処理した際に発現上昇してくる 5 個の遺伝子の内の 1 つとして遺伝子クローニングされた OTS-8⁷⁾ と似通ったものであった。この分子は、末梢リンパ節の T 細胞依存領域に存在する I 型胸腺上皮細胞と間質細胞に発現している膜タンパク質として gp38、ラットの骨芽細胞系マーカーとして E11 antigen、ラット肺の I 型肺上皮細胞上に発現している分子として T1 α 、ラットの腎糸球体上皮細胞 (podocyte) に発現している分子として podoplanin、さらに gp40、gp36、gp38P、PA2.26、RANDOM-2 などさまざまな名前でも報告されているが (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=10630>)、癌転移との相関は明らかではなかった。

そこで、T1 α /podoplanin/OTS-8 遺伝子の発現量比較を行った結果、転移能に相関して NL-17 細胞で

※ 1 platelet-rich plasma

血小板を多く含んだ血漿のこと。抗凝固剤であるヘパリン存在下で採血後、血液を速やかに室温 (23℃前後) で 230Xg、7 分遠心し、血漿および血小板層を分取したもの。血小板自体が外部刺激 (機械的な刺激、温度変化など) に敏感であるため、分離から使用まで室温で取り扱うとともに、なるべく速やかに実験に供する。



A) 8F11 抗体はマウス Aggrus の 39 ~ 44 番目の DGMVPP 配列を認識するが、抗体の結合に伴って 34 番目のスレオニンに付加されている糖鎖を立体的に障害する。その結果、Aggrus による血小板凝集が阻害される。B) マウス Aggrus のホモログがヒト、ラット、ドッグで見出されているが、全体のアミノ酸レベルのホモロジーはきわめて低い。しかし、マウス Aggrus で見出された糖鎖結合部位周辺の配列は、これらホモログ間できわめて高度に保存されており、ヒト、ラット、ドッグでも*印が付いているスレオニンに変異を入れると、これらホモログの血小板凝集活性が失われる。そこで血小板凝集活性に必須な部位として PLAG domain と命名した (文献 6 より改変、引用)

図 3 Aggrus 上の血小板凝集活性に必須な部位 (PLAG domain) の同定

は T1 α /podoplanin/OTS-8 遺伝子の発現亢進が認められた (図 2 A)。さらに CHO 細胞に遺伝子導入した結果、8F11 抗体はこの分子を認識した。また、CHO 細胞に発現させた場合、マウスおよびヒト PRP を凝集させる活性が認められた。さらに siRNA をデザインして NL-17 細胞に導入した結果、NL-17 細胞における Aggrus タンパク質の発現量が減少した (図 2 B)。以上の結果より、8F11 抗体の認識する Aggrus 分子は、T1 α /podoplanin/OTS-8 などさまざまな名前ではばれる分子と同一であることが確認された⁶⁾。この分子の癌における機能は不明であったことから、われわれがはじめて見出したこの分子の血小板凝集能にちなんで、Aggregation させる分子ということで Aggrus と命名し、GenBank に登録を行った (Accession No. ABI27958)。

③ 8F11 抗体による Aggrus 依存的血小板凝集の阻害機構

Aggrus のタンパク質断片や点突然変異をもつ Aggrus に対する 8F11 抗体の反応性を検討した結果、マウス Aggrus の 39 番目から 44 番目のアミノ酸配列 (DGMVPP) を認識していることが明らかとなった。そこで 8F11 抗体に認識されない 41 番目のメチオニンをアラニンに置換した変異 Aggrus (M41A) を作製し CHO 細胞に発現させた。しかし、この M41A-

Aggrus の血小板凝集能は野生型のものと同差なく、血小板上にある未知のレセプター分子と Aggrus との結合にかかわる部位を 8F11 抗体が結合しマスクするために血小板凝集が阻害されているのではないことがわかった。

Aggrus には多数の糖鎖が付加されていること、Aggrus に付加されているシアル酸が血小板凝集活性に重要な役割を果たしているという結果⁵⁾ から、8F11 抗体はその認識部位に結合することにより、結合部位周辺に付加されている糖鎖の立体構造を変化させ (図 3 A)、その結果 Aggrus の血小板凝集活性が失われているものと予想し検討を行った。点突然変異をもつ Aggrus を発現させその血小板凝集活性を検討した結果、糖鎖が付加されていると予想される 34 番目のスレオニンをアラニンに置換した T34A-Aggrus には、血小板凝集活性が認められないことを見出した。糖鎖が血小板凝集活性に重要な働きをしていることは、糖鎖合成不全の変異 CHO 細胞 (Lec2 と Lec8 細胞) を用いることによっても証明できている⁸⁾。よって、34 番目のスレオニンに付加されている糖鎖が Aggrus による血小板凝集に重要な働きをしていること、また 8F11 抗体は Aggrus に結合することにより、その糖鎖を立体的に障害し血小板凝集活性を中和していることが明らかとなった (図 3 A)⁶⁾。血小板凝集活性に重