

## ヒト腫瘍における Podoplanin の糖鎖構造解析および免疫組織学的解析

○加藤幸成、金子美華、小笠原 諭、伊藤浩美、亀山昭彦、成松 久  
(独) 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター)

Podoplanin expression in human tumors: glycan structure and immunohistochemical analysis

Yukinari Kato, Mika Kato Kaneko, Satoshi Ogasawara, Hisashi Narimatsu

(Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST))

The mucin-type sialoglycoprotein, podoplanin (aggrus) is expressed specifically on lymphatic endothelial cells, not on vascular endothelial cells. Recent investigations have shown up-regulated expression of podoplanin in human tumors. In this study, we established novel monoclonal antibodies, YM-1 or NZ-1, which can highly recognize podoplanin on lymphatic endothelial cells or cancer cells by flow cytometry, Western-blot, and immunohistochemical analyses. Podoplanin was expressed in esophageal or lung squamous cell carcinoma, testicular seminomas, and brain tumors. Interestingly, podoplanin is expressed markedly higher in glioblastomas in astrocytic tumors. Using glioblastoma cell lines, glycan structure of podoplanin was analyzed.

**【背景・目的】** Podoplanin は、LYVE-1, Prox1, VEGFR-3 とともに、リンパ管内皮細胞の特異的マーカーとして発見され、これまで困難であった血管内皮細胞との組織学的鑑別が容易となった。我々は、podoplanin が血小板凝集活性を持つことを発見し (別名 Aggrus)、癌細胞による血小板凝集や、マウスの実験的転移の系において、癌細胞の血行性転移に重要であることを報告してきた。さらに近年、悪性中皮腫などの様々なヒト腫瘍においても podoplanin が発現していることが報告され、腫瘍マーカーとしての開発も期待されている。本研究では、新規抗ヒト podoplanin 抗体を作製し、様々なヒト腫瘍における podoplanin の免疫組織学的解析を行った。また、Western-blot、Real-time PCR により、podoplanin の定量的発現解析を行った。さらに、podoplanin の発現の高い膠芽腫細胞を用いて、その糖鎖構造解析を行った。

**【材料と方法】** 免疫組織染色には、ヒト podoplanin の 38 番目から 51 番目のアミノ酸からなる合成ペプチドを抗原として、ラットに免疫して作製したモノクローナル抗体 (YM-1、NZ-1) を使用した。症例は Table 1 に示すように、脳腫瘍 (132 症例)、肺癌 (188 症例)、食道癌 (65 症例)、胃癌 (72 症例)、結腸癌 (66 症例)、直腸癌 (57 症例)、精巣腫瘍 (24 症例)、メラノーマ (38 症例) の組織アレイ (合計 642 症例) を用いた。また、astrocytic tumors (58 症例) の組織から抽出した蛋白や RNA を用いて、Western-blot や Real-time PCR を行った。膠芽腫細胞 LN319 から podoplanin を精製し、質量分析計 (MS) により糖鎖構造を解析した。

**【結果】** NZ-1 抗体による免疫組織染色の結果を Table 1 に示す。脳腫瘍のうち、astrocytic tumor の grade 別に podoplanin の発現を調べると、diffuse astrocytoma (grade 2) では 0% (0/22)、anaplastic astrocytoma (grade 3) では 20.7% (6/29) と発現が低いのに対し、glioblastoma (grade 4) では 44% (36/81) と高い発現率を示し、悪性度と相関した podoplanin の発現が見られた。Western-blot や Real-time PCR 法でも、同様の結果が得られた。肺癌においては、扁平上皮癌のみに podoplanin の発現が見られ、組織型特異的な発現が見られた。それに対し、胃癌、大腸癌などの腺癌やメラノーマなどには podoplanin の発現は見られなかった。また、LN319 から精製した podoplanin には disialyl-core1 構造が付加されており、機能に重要な役割を果たしていることがわかった。

【考察】本研究では、免疫組織染色において、感度・特異度の高い抗 podoplanin 抗体を用いることにより、組織型特異的、あるいは悪性度と関連した podoplanin の発現が見られた。また、ヒト腫瘍組織を用いて、Western-blot や Real-time PCR によっても podoplanin の発現を確認した。マウスでは、colon26 などの大腸癌細胞や、B16 などのメラノーマ細胞に podoplanin の発現が見られる。さらに colon26 や B16 からそれぞれ樹立された高転移性株である NL-17 や B16/F10 には、高い podoplanin の発現が見られ、podoplanin の発現と転移能との相関が報告されている。しかしながら、本研究において、ヒト大腸癌やメラノーマにおける podoplanin の発現を検討したところ、全く発現していないことがわかった。このように、podoplanin がヒト腫瘍においてどのような役割を果たしているのかはまだ不明な点が多く、今後の課題である。

本研究における糖鎖構造解析は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) からの委託を受けて実施したものである。

Table 1 Results of podoplanin staining by NZ-1 (642 cases)

Tumor type	No. of cases	Podoplanin immunostaining			
		+++	++	+	-
<b>Brain tumor</b>	132				
<i>diffuse astrocytoma</i>	22	0	0	0	22
<i>anaplastic astrocytoma</i>	29	3	2	1	23
<i>glioblastoma</i>	81	23	8	5	45
<b>Lung carcinoma</b>	188				
<i>squamous cell carcinoma</i>	52	2	7	5	38
<i>adenocarcinoma</i>	82	0	0	0	82
<i>large cell carcinoma</i>	23	0	0	0	23
<i>small cell carcinoma</i>	31	0	0	0	31
<b>Esophageal squamous cell carcinoma</b>	65	5	3	6	51
<b>Stomach adenocarcinoma</b>	72	0	0	0	72
<b>Colon adenocarcinoma</b>	66	0	0	0	66
<b>Rectal adenocarcinoma</b>	57	0	0	0	57
<b>Testicular seminoma</b>	24	24	0	0	0
<b>Malignant melanoma</b>	38	0	0	0	38

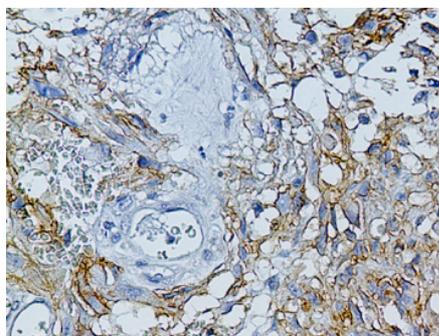


図 1 : glioblastomaにおけるpodoplaninの発現

## 【文献】

- (1) Suzuki-Inoue K., Kato Y. et al., Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2 in podoplanin-mediated platelet activation by cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2007
- (2) Kaneko MK., Kato Y. et al., Functional glycosylation of human podoplanin: Glycan structure of platelet aggregation-inducing factor. *FEBS Lett.* 23;581(2):331-336, 2007.
- (3) Kato Y., Kaneko MK. et al., Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349(4):1301-1307, 2006.
- (4) Mishima K., Kato Y. et al., Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol*; 111(5): 483-488, 2006.
- (5) Kaneko MK., Kato Y. et al., Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/podoplanin as a platelet aggregation-inducing factor. *Gene*, 378C: 52-57, 2006.
- (6) Mishima K., Kato Y. et al., Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma. *Acta Neuropathol.*111(6):563-568, 2006.
- (7) Kato Y., Kaneko M. et al., Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumor Biol.* 26 (4) 195-200, 2005.
- (8) Kato Y., Sasagawa I. et al., Aggrus: A diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Oncogene.* 23, 8552-8556, 2004.
- (9) Kaneko M., Kato Y. et al., Functional sialylated O-glycan to platelet aggregation on Aggrus (T1alpha/Podoplanin) molecules expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 279, 38838-38843, 2004.
- (10) Kato Y., Fujita N. et al., Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors. *J. Biol. Chem.* 278, 51599-51605, 2003.