

審査の結果の要旨

氏名 加藤幸成

癌の転移において、癌細胞と血小板の相互作用が重要な役割を果たしている。Tsuruo らは、マウスの結腸癌細胞株 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。さらに NL-17 細胞に高反応性を示し、NL-14 細胞には低反応性のモノクローナル抗体 8F11 抗体が取得された。8F11 抗体は 44kDa の糖タンパク質 gp44 を認識した。NL-17 細胞はマウスの血小板凝集を引き起こすが、8F11 抗体をその凝集系に加えると、NL-17 依存的な血小板凝集が阻害された。さらに、NL-17 細胞の実験的肺転移が 8F11 抗体の投与により阻害された。このことから、がん細胞膜の血小板凝集因子により血小板が凝集され、その結果、NL-17 細胞の肺転移が起こることが示唆されている。NL-17 細胞より精製されたこの因子は血清因子非存在下で血小板凝集を引き起こし、O-結合型の糖鎖が多く付加されていることがわかった。

本研究では、この血小板凝集因子の遺伝子をクローニングし、この遺伝子産物を新たに Aggrus と命名し、分子生物学的手法を用いて機能解析を行うと共に、ヒト腫瘍における Aggrus 発現を解析することにより以下の成果を得た。

1、血小板凝集因子 Aggrus の遺伝子クローニング

Aggrus は細胞膜に発現する sialoglycoprotein であり、その分子量や発現分布などの生化学的特徴の類似性から、T1 α /podoplanin という分子と同一である可能性が考えられた。T1 α は I 型肺胞上皮細胞のマーカーとして、podoplanin はリンパ管のマーカーとして広く使われている。まず、Aggrus を発現しており、血小板凝集能のある NL-17 細胞において、RT-PCR 法を用いて T1 α /podoplanin の mRNA の発現を確認した。その結果、Aggrus 蛋白の発現量が NL-17 細胞より少ない NL-14 細胞では、T1 α /podoplanin の mRNA 発現量が少ないことが確認された。そこで、NL-17 細胞より T1 α /podoplanin 遺伝子をクローニングし、CHO 細胞に導入した株 (CHO/mAGR) を樹立した。8F11 抗体を用いた Western-blot 法により、CHO/mAGR に約 44kDa の蛋白発現が確認された。さらに NL-17 細胞に T1 α /podoplanin の siRNA を導入すると 8F11 抗体による認識が抑制された。また、CHO/mAGR はマウス血小板凝集を誘導し、この血小板凝集は 8F11 抗体により完全に抑制された。以上より、T1 α /podoplanin が Aggrus と同一分子であることが確認された。同様に、ヒト肺の cDNA ライブラリーからヒト Aggrus をクローニングし、CHO 細胞に導入した株 (CHO/hAGR) を作製したところ、CHO/hAGR によってもヒト血小板が凝集することが確認された。CHO/mAGR はマウス血小板だけでなくヒト血小板をも凝集させ、CHO/hAGR もヒト血小板だけでなくマウス血小板をも凝集させた。また、CHO/hAGR をヌードマウスに尾静注したところ、CHO/mock に比べ有意に肺転移をおこし

ていた。

2、血小板凝集因子 Aggrus の活性部位の検索

8F11 抗体はマウス Aggrus (mAggrus)による血小板凝集を中和するため、mAggrus の活性部位を認識していると推測された。また、糖鎖除去により血小板凝集活性が失活することから、8F11 抗体の認識部位は糖鎖そのものか、あるいは糖鎖付加部位の近傍に位置するペプチド鎖であることが予想された。大腸菌に発現させた mAggrus が 8F11 抗体で認識されたことから、8F11 抗体の認識部位が糖鎖ではないことがわかった。そこで、mAggrus の活性部位を同定するため、大腸菌に mAggrus の deletion mutant を発現させたところ、8F11 抗体は mAggrus の 39-DGMVPP-44 のペプチド部分を認識した。さらに、mAggrus の G40A (Gly40 →Ala)、M41A、V42A、P43A の point mutant は 8F11 抗体に認識されず、39-DGMVPP-44 が 8F11 抗体のエピトープであることが確認された。39-DGMVPPGIE-47 の合成ペプチドでも予想通り 8F11 抗体に認識されたが、合成ペプチド単独では血小板凝集活性を示さなかった。また、大腸菌に発現させた Aggrus によっても血小板凝集誘導活性が認められなかった。従って、Aggrus による血小板凝集活性には糖鎖の付加が必要であることが示され、8F11 抗体が mAggrus の 39-DGMVPP-44 に結合し、このペプチド鎖の近傍に結合している O-糖鎖に対する立体障害により、血小板凝集活性を阻害するのではないかと考えられた。

そこで、8F11 抗体のエピトープ近傍の糖鎖付加の可能性のある Thr を Ala に置換した point mutant を作製した。その結果、T37A、T51A、T52A は血小板凝集活性を示したのに対し、T34A は血小板凝集活性を示さなかった。マウス、ヒト、ラット、イヌの Aggrus について、アミノ酸配列の比較を行ったところ、マウスの Thr34 を含む EDXXVTPG という配列（マウスでは 29-EDDIVTPG-36）が種を越えて保存されていることが判明した。hAggrus では、T52A は血小板凝集活性を示さなかった。そこで、この EDXXVTPG 配列を PLAG (Platelet Aggregation-stimulating) domain と命名した。

3、ヒト腫瘍における Aggrus 発現の検討

mAggrus はマウス大腸癌細胞に高発現しており、その発現量は正常のマウス大腸における発現量よりも多い。hAggrus の発現についても、Cancer Profiling Array (BD Biosciences Clontech) を用いて検討した。その結果、hAggrus は、直腸、結腸、小腸のほとんどすべての症例でそれぞれの正常組織に比べ癌部で発現が有意に上がっていることが示されている。hAggrus の Tumor/Normal (T/N) 比の平均は、直腸 3.2 (n=7)、結腸 2.8 (n=10)、小腸 3.9 (n=10) であった。それに対し、他の臓器の腫瘍では患者ごとに hAggrus の発現にばらつきがあり、後述の精巢を除き T/N 比の平均値は 1.5 以下で低値であった。さらに大腸癌での hAggrus タンパクの発現を確認するために、hAggrus の 38-51 番目のアミノ酸配列に相当するペプチドを免疫し、抗 hAggrus ポリクローナル抗体(TT679)を作製した。TT679 抗体はヒト大腸癌の切片に高反応性を示した。

次に、精巣胚細胞腫瘍の中で、セミノーマ、胎児性癌における hAggrus の発現を調べた。まず、Cancer Profiling Array や real-time PCR 法によって検討したところ、精巣胚細胞腫瘍では正常精巣組織に比べ hAggrus の高い発現が見られ、T/N 比の平均値は 4.3 (n=10) であった。TT679 抗体による免疫組織染色では、11 例中 10 例 (90.9%) のセミノーマに高い染色性を示したのに対し、4 例の胎児性癌には全く染色性を示さなかった。この結果より、hAggrus が精巣腫瘍の中でもセミノーマ特異的に発現していることが示された。セミノーマは精巣胚細胞腫瘍の中で唯一放射線感受性が高いため予後が良く、早期診断は臨床上重要である。セミノーマに対する特異的マーカーはなく、hAggrus がセミノーマの特異的マーカーとして臨床的に有用である可能性が示唆されていた。

次に、各腫瘍を組織型別に分類し、T/N 比を比較した。肺癌においては、T/N 比の平均は 1.6 (n=30) であるが、肺癌を組織型別に分類して hAggrus の発現を比較したところ、扁平上皮癌では腺癌に比べ hAggrus の発現が有意に高いことがわかった。肺扁平上皮癌では T/N 比の平均値が 2.2 (n=15) であるのに対し、腺癌では T/N 比の平均値は 0.9 (n=12) であった。さらに、TT679 抗体を用いた免疫組織染色では、8 症例中 7 症例の扁平上皮癌 (87.5%) が陽性であったのに対し、腺癌については 13 症例中 2 症例 (15.4%) のみが陽性であった。この結果は、肺扁平上皮癌の腫瘍マーカーの SCC や CYFRA よりも陽性率が高いものであった。これらの結果より、hAggrus は肺扁平上皮癌でのマーカーとして、また分子標的療法のターゲットとしても期待される。ヒト肺癌由来の樹立細胞における hAggrus の発現を調べたところ、肺扁平上皮癌の NCI-H226 細胞に hAggrus が発現していることが、real-time PCR 法、flow cytometry 法により示された。それに対し、肺腺癌細胞である A549 細胞、NCI-H23 細胞、NCI-H522 細胞には hAggrus の発現は認められなかった。NCI-H226 細胞をマウス血小板と混ぜたところ、血小板凝集が引き起こされた。このことにより、NCI-H226 細胞が血小板凝集活性を有しており、さらに *in vivo* における転移活性を持っている可能性が示唆された。

以上、本研究は、癌細胞上に発現している血小板凝集因子 Aggrus の遺伝子クローニングに成功し、分子生物学的研究により Aggrus の活性部位である PLAG domain を明らかにした。さらに、Aggrus が大腸癌、肺扁平上皮癌、精巣セミノーマで特異的に発現していることを明らかにしたものであり、博士 (薬学) の学位に値するものと判断した