

ガン細胞 podoplanin と血小板 CLEC2 との相互作用阻害の創薬ターゲットとしての可能性の評価、 ならびにその低分子阻害化合物選択のための評価系の構築

Evaluation of the interaction of tumor cell podoplanin and platelet CLEC2 as a therapeutic target, and establishment of an assay system for small-molecule inhibitors of podoplanin-CLEC2 interaction.

渡邊 伸央^{1,2)}、城所 正子¹⁾、田中 真紀子¹⁾、平山 令明²⁾、猪口 貞樹^{1,2)}

¹⁾東海大学医学部救命救急医学、²⁾東海大学先進生命科学研究所

Nobuo Watanabe^{1,2)}, Masako Kidokoro¹⁾, Makiko Tanaka¹⁾, Noriaki Hirayama²⁾, Sadaki Inokuchi^{1,2)}

¹⁾Department of Emergency and Critical Care Medicine, School of Medicine, Tokai University

²⁾Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

血小板膜上 CLEC2 とガン細胞膜上の podoplanin との結合は、ガン細胞に上皮間葉転換(EMT)を誘導し、組織浸潤ならびに転移を促進することが示唆されている。我々はこの2者の結合阻害が創薬のターゲットになるか否かを評価するため、食道扁平上皮ガン TE11 細胞の podoplanin 遺伝子をノックアウトし、組織浸潤のために重要な過程である上皮間葉転換(EMT)に対する影響を調べた。podoplanin のノックアウトは、N-cadherin の自発的発現を誘導し、TGF-β による EMT 関連遺伝子の発現増強を引き起こした。しかし、血小板刺激による EMT 関連遺伝子発現に対しては podoplanin 欠損細胞で消失した。そこで podoplanin と CLEC2 との結合を阻害する化合物を探索すべく、イムノグロブリン Fc 領域融合 CLEC2 を用いて podoplanin を捕捉するプルダウン系を構築し、さらにスロットブロット法を組み込み、化合物ライブラリーからも効率的なスクリーニングが可能な high throughput 評価系を確立した。

[Abstract]

The interaction between platelet CLEC2 and tumor cell podoplanin has been suggested to induce mesenchymal transition (EMT), enhancing tumor's ability of invasion and metastasis. In this study, we assessed, using genetic knock-out approach, whether the intervention of these molecular interaction could be a therapeutic target. Podoplanin knock-out in TE11 cells resulted in spontaneous induction of N-cadherin along with hyper-responsiveness with TGF-β in terms of EMT gene expression. Nevertheless podoplanin knock-out cells lost their ability to respond to platelets in terms of EMT gene expression. Therefore we have established a pull-down assay of podoplanin using immunoglobulin Fc- CLEC2 fusion protein. To effectively select inhibitory compounds from a large source of compounds, slot blot was combined with the pull-down assay, thus enabling the assay compatible with high-throughput screening of compounds.

[Key Words]

tumor, metastasis, EMT, protein-protein interaction, high-throughput

1. はじめに

Podoplanin は、リンパ管上皮細胞や腎臓の podocyte に構成的に発現する糖タンパク質である。Podoplanin は血小板活性化ドメイン(PLAG)を有し、血小板上の膜タンパクの CLEC-2 と結合して血小板活性化を引き起こす。一方、種々の悪性腫瘍ならびにガン細胞においては podoplanin の発現が亢進し、予後の悪さと相関

する[1]。この機序としては、i) podoplanin の発現それ自体により細胞特性が間葉系側へシフトし、移動・浸潤能の亢進が起ることが提唱されている [2]。さらに、ii) 血小板に脱顆粒を誘導し、TGF-β などの血小板由来の因子によって、ガン細胞に上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)を誘導し、転移・浸潤能を高めている可能性も示唆されている[3]。

実際、抗 podoplanin 抗体は血小板凝集を抑制し、免疫不全マウスに移植した podoplanin 陽性腫瘍細胞株の増殖と肺転移を抑制することが示されている[4]。

これらのメカニズムには未だ不明な点が多いものの、podoplanin の機能抑制は抗腫瘍剤の標的の一つと考えられる。そこで本研究では食道扁平上皮ガン TE11 細胞の podoplanin を knock-out し、EMT 応答に対する影響を調べ、創薬のターゲットとしての可能性を探った。さらに、阻害剤選択のためのハイスループットスクリーニング系を作成した。

2. 結果の概要ならびに考察

1) Podoplanin ノックアウト TE11 細胞の樹立と EMT への影響

我々は Crispr/Cas9 によるゲノム編集法を用い、食道扁平上皮ガン TE11 細胞の podoplanin 遺伝子の knock-out を試みた。本法のための all-in-one 型の発現ベクターを作成し[5]、あらかじめ樹立した TE11 細胞サブクローンヘレクトロポレーションによって導入した。限界希釈によるクローニングを経て、最終的にヘテロ・ノックアウト(clone 2)とホモのノックアウト(clone 4)細胞を樹立した。

ガン細胞において podoplanin は血小板活性化因子として注目されている。そこでこれらの細胞の血小板凝集活性を測定した。TE11 細胞親細胞による血小板凝集は、threshold となる細胞密度以上での添加で速やかに誘導されたが、それ以下では全く起らず、all-or-none 型の凝集誘導を示した。しかしながら、podoplanin を完全に欠く clone 4 細胞にも親細胞とほぼ血小板凝集能が認められた。以上の結果より、TE11 細胞による血小板凝集は種々の機序に担われており、TE11 細胞による血小板凝集に占める podoplanin の寄与は小さいことが判明した。

興味深いことに podoplanin 遺伝子の knock-out は、ホモ、ヘテロとも、それ自体で選択的に N-cadherin の発現が起った。これは mRNA だけでなくタンパク質レベルでも検出された。また、EMT 誘導刺激に反応した遺伝子発現では親細胞に比べて明瞭な差異がみられた。まず血小板刺激は親細胞において N-cadherin、vimentin や plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)などの発現誘導したが、podoplanin 遺伝子のホモのノックアウト細胞では vimentin や PAI-1 の発現誘導が起らなくなった。このような抑制は podoplanin の中和抗体(NZ-1)の添加で血小板との相互作用を阻害した場合にも同様に見ら

れた。一方、N-cadherin に対してはホモのノックアウトでも血小板により更なる発現上昇が見られた。一方、TGF- β による刺激では、N-cadherin、vimentin や PAI-1 のいずれの発現もヘテロ、ホモのノックアウトになるほど、発現誘導が亢進した。以上の結果から、TE11 細胞の EMT は複雑であるが、podoplanin と CLEC2 との結合阻害は EMT 誘導を阻害し、抗腫瘍剤の標的としてふさわしいと結論された(以上、論文投稿中)。

2) CLEC2 と Podoplanin の結合に対する阻害剤評価系の構築

昨年度、イムノグロブリンの Fc 領域を C 末端側に融合させた CLEC2 (以下 CLEC2-Fc)を遺伝子組み換えにより作成し、podoplanin 過剰発現 HeLa 細胞の podoplanin のプルダウンを試みた。Podoplanin を捕捉した CLEC2-Fc を Protein A ビーズによって沈降させ、SDS-PAGE & ウェスタンブロットで、補足された podoplanin の検出を行った。しかしながら、この CLEC2-Fc では podoplanin の効率的な捕捉は見られなかった。

CLEC2 は 2 型膜タンパク質であり、C 末端側が細胞外ドメインとなる。このため、CLEC2 の N 末端側へ Fc ドメインを結合させるほうが、CLEC2 の細胞外ドメイン構造の自由度を保つのに寄与することが推測される。そこで今年度は、Fc 領域を N 末端側に融合させた CLEC2 (以下 Fc-CLEC2)を作成して podoplanin のプルダウンを試みた。この結果、今回の Fc-CLEC2 では効果的に podoplanin がプルダウンできることが判明し、これを用いて化合物の阻害能評価系の構築が可能となった。

さて、通常のプルダウン・アッセイでは、未結合のリガンドと、キャリアビーズに結合したレセプターに捕捉されたりガンドとの分離が必要である。この操作は通常、遠心分離によるビーズの沈降とピペット吸引による上清除去操作を繰り返して行う。次の電気泳動・ウェスタンブロットでは、これらのサンプルを 1 つずつゲルにアプライする必要がある。これらの操作は時間と労力を要する。さらに 1 枚のゲルで泳動できるサンプルは 10 数個である。これらの制限は、プルダウンによるアッセイでは、化合物ライブラリーからの数千、数万の化合物の評価することは事実上不可能であることを意味する。

そこで我々は今回、Fc-CLEC2 による podoplanin のプ

ルダウン・アッセイのハイスループット化を試みた。まず、キャリアビーズの洗浄を、市販のポアサイズ 0.65 μm のフィルターユニット(Millipore, Ultra free MC)を用いて行うことにした。これにより、ピペットによる洗浄液の吸引除去操作が不要になり、またマルチチャンネルピペットの併用により、多数のサンプルの洗浄を同時に行えるようになった。また洗浄後の酸処理でのビーズから解離するタンパク質分子は Fc-CLEC2 と podoplanin のみであることから、電気泳動で分離することを廃し、スロットプロット装置で直接 PVDF 膜へ吸着させることにした。スロットプロット装置は 48 ウェルであるので、ゲル 4 枚分のイムノプロットを 1 枚の膜で評価できる利点もある。

ブルダウン後のサンプルをウエスタンプロットとスリットプロットとで比較した結果、podoplanin、Fc-CLEC2 の濃度依存性は同じであった。近年、hematoporphyrin が Fc-CLEC2 と podoplanin との結合を阻害することが示された[6]。本系においても 10 μM で完全抑制が見られることが確認でき、化合物の選別が可能であることが示された。以上の結果より、本評価系を用いて今後、Fc-CLEC2 と Podoplanin との結合阻害に基づく抗腫瘍剤の開発が飛躍的に進むことが期待される(以上、論文投稿中)。

3. 引用文献

1. Tanaka M, Kijima H, Shimada H, Makuuchi H, Ozawa S, et al. (2015) Expression of podoplanin and vimentin is correlated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* 12: 4029-4036.
2. Martin-Villar E, Megias D, Castel S, Yurrita MM, Vilaro S, et al. (2006) Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 119: 4541-4553.
3. Takemoto A, Miyata K, Fujita N (2017) Platelet-activating factor podoplanin: from discovery to drug development. *Cancer Metastasis Rev* 36: 225-234.
4. Takagi S, Sato S, Oh-hara T, Takami M, Koike S, et al. (2013) Platelets promote tumor growth and metastasis via direct interaction between Aggrus/podoplanin and CLEC-2. *PLoS One* 8: e73609.
5. Miyata K, Takemoto A, Okumura S, Nishio M, Fujita N (2017) Podoplanin enhances lung cancer cell growth in vivo by inducing platelet aggregation. *Sci Rep* 7: 4059.
6. Tsukiji N, Osada M, Sasaki T, Shirai T, Satoh K, et al.

(2018) Cobalt hematoporphyrin inhibits CLEC-2-podoplanin interaction, tumor metastasis, and arterial/venous thrombosis in mice. *Blood Adv* 2: 2214-2225.

4. 業績

【論文発表】

論文投稿中

5. 謝辞

本研究を行うにあたり種々のご助言、援助をいただきました東海大学医学部生体防御学・佐藤健人准教授、赤塚尚子氏、再生医学研究センター八幡崇准教授、東海大学・教育研究支援センター・塚本秀雄博士、岡田義則博士、佐々木亜希子氏に感謝いたします。