168　血小板が誘導する骨軟部肉腫の増殖・転移機構の解明	大場　哲郎

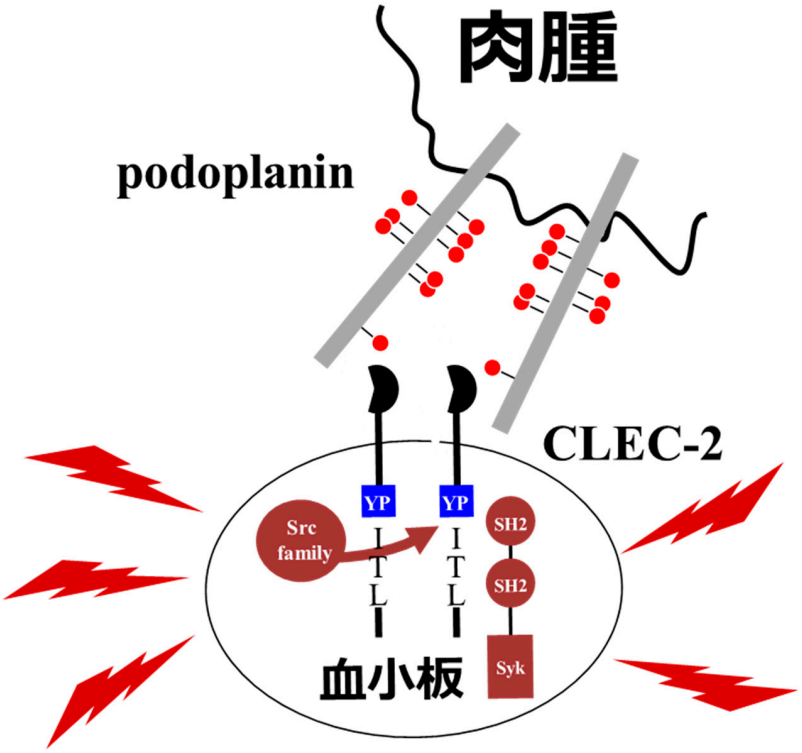
【目的】骨軟部肉腫は年間新規患者数が約 3000 人程度の希少癌の一つであり、化学療法と手術での広範切除の施行で生存率は上昇したが、遠隔転移例の予後は依然不良である。遠隔転移の大半が肺転移であるため、特に肺転移機序の解明は予後改善に直結する。以前より癌の血行性転移に血小板が促進的に働くとの報告があり、近年他癌腫ではあるが、血小板 C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2) と腫瘍ポドプラニンとの相互作用が注目されている。本研究において、骨肉腫ポドプラニンと血小板 CLEC-2 の相互作用を解明することで新規治療ターゲットへと発展させたい。

【方法】血小板は健常人から採取し、ヒト骨肉腫細胞として高肺転移株 143B を使用し、以下の実験を計画した。

1. 骨肉腫ポドプラニンの発現の有無、更に血小板との凝集の有無と凝集におけるポドプラニンの役割、2. 血小板を骨肉腫細胞との共培養で活性化した上清と活性化していない上清を用いて、骨肉腫の増殖・移動能への影響、3. 血小板 CLEC-2 をターゲットにした新規治療の可能性、について実験を行った。

【結果】1. 骨肉腫 143B 細胞でのポドプラニンの発現を FACS で確認した。また、143B とヒト血小板との凝集を凝集計で確認した。更に、この凝集はポドプラニンブロッキング抗体で抑制された。2. 143B とヒト血小板を共培養して反応させた上清を回収した。ヒト血小板に 143B を共培養した反応液が、増殖、移動能とも最大であった。3. CLEC-2 抗体により CLEC-2 欠損モデルを使用し、143B を尾静脈から注射すると有意に肺転移が抑制された。

肉腫ポドプラニンと血小板 CLEC-2 との相互作用



168. 血小板が誘導する骨軟部肉腫の増殖・転移機構の解明

大場　哲郎

山梨大学 医学部 整形外科学講座

Key words：骨肉腫，血小板，CLEC-2，ポドプラニン，転移

緒　言

骨軟部肉腫は年間新規患者数が約 3,000 人程度であり、骨原発の肉腫は若年者の発症が多く、軟部原発の肉腫は中高年が多い。骨軟部肉腫の中でも、骨肉腫は患者数も多く、術前後の化学療法と手術での広範切除の施行で 20%であった 5 年生存率が 60～70%へと上昇したが、化学療法不応例や遠隔転移例の予後は不良であることに変わりはない。骨肉腫同様に他の肉腫でも、遠隔転移の大半が肺転移であるため、腫瘍の増殖と共に肺転移機構を解明し、治療へ応用出来れば、それは直接予後改善につながる。約半世紀の間、新規抗がん剤や分子標的剤の登場はなく、化学療法のレジメンも変わらないのが現状であり、新規治療ターゲットの探索が急務であった。

以前より癌の血行性転移に血小板が促進的に働くとの報告があり、その機序として 1）血管内で腫瘍表面に血小板が凝集し、更に血小板は活性化され、血管内のシェアストレスや免疫細胞の攻撃から腫瘍細胞を守る、2）粘着した血小板が、腫瘍細胞に血管外浸潤の足場を提供する、3）血管外浸潤後、転移巣にて活性化血小板から放出された増殖因子や血管新生因子により、腫瘍の転移が促進される、と考えられている。また、活性化血小板より放出された TGF-β、PDGF などが、原発巣の腫瘍に Endothelial Mesenchymal Transition（EMT）を惹起し、転移を促進するという報告もある［1］。この EMT は骨肉腫でも他の癌腫と同様に転移のステップに必須である［2］。血小板の凝集と活性化の機序の一つに腫瘍直接的なものと、間接的なものがある。その直接的な機序の一つに扁平上皮癌の一部などに発現する膜蛋白、ポドプラニンがあり、以前より *in vitro* での血小板凝集・活性化能は報告されていた。さらに、ポドプラニンの発現が多い腫瘍ほど、悪性度が高く、予後が悪いという臨床研究も報告されている。このことから、ポドプラニンと血小板の結合を抑制できれば癌の増殖・転移を抑制できると考えられたが、ポドプラニンの血小板上受容体は長らく不明であった。共同研究者の井上らは血小板上に新規活性化受容体 C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2) を同定し[3]、そのリガンドがポドプラニンであることを発見した［4］。我々は、肉腫の増殖や転移に於いて、肉腫のポドプラニン発現が関与し、そのポドプラニンに活性化された血小板が重要な役割を担っているとの仮説を立てた。これまでにポドプラニンをターゲットにした研究は、前立腺癌や頭頸部腫瘍などであり、マウスモデルで抗ポドプラニン抗体の治療効果が報告されているが、CLEC-2 をターゲットにした抗腫瘍効果の報告はない。本研究において、骨肉腫ポドプラニンと血小板 CLEC-2 の相互作用を解明し、血小板の持つ骨肉腫の転移・増殖誘導能を明らかにすることであり、 CLEC-2 をターゲットにした新規治療を開発することが期待される。

方　法

血小板は健常人から採血し、PRP を作成ののち、洗浄血小板を精製した。骨肉腫細胞はヒト骨肉腫細胞を ATCC より購入した。マウス実験は山梨大学動物実験倫理員会より承認を受けている。統計学的検討は Student's t-tests を用いて検討した。

1. 骨肉腫ポドプラニン発現と血小板との凝集の有無

①骨肉腫細胞株（低転移株 TE85、高肺転移株 143B）におけるポドプラニンの発現を Flowcytometry で検討した。②ヒト洗浄血小板と骨肉腫細胞の凝集の有無を凝集計で確認した。また、ポドプラニン抗体を用いて、凝集が変化するかを検討した。

2. 血小板活性化による骨肉腫の増殖・浸潤への影響

①ヒト骨肉腫細胞高肺転移株（143B）とヒト洗浄血小板を 30 分共培養ののち、遠心して得られた上清（B）と血小板のみの上清（A）を準備した。血小板特異的なサイトカインとして Platelet Factor-4（PF-4）また、血小板含有が多いとされる TGF-β、PDGF を ELISA で測定した。この（A）（B）を用いて以下の実験を行った。②移動能への影響；Boyden Chamber アッセイを用いた。上層は培地のみとし、下層に（A）、（B）を添加した。膜の下側をクリスタルバイオレットで染色し、OD 値を測定した。移動した細胞数を顕微鏡下に計測した。

3. 血小板 CLEC-2 をターゲットにした新規治療の可能性

CLEC-2 抗体をマウス投与し、CLEC-2 欠損状態を作製した。①ルシフェラーゼ遺伝子を導入したヒト骨肉腫細胞を尾静脈から投与した。3 週で転移が成立することを予備実験でしているので、その時点でのルシフェラーゼでの蛍光強度の測定、肺を摘出し、顕微鏡下で転移数をカウントした。

結　果

1. 骨肉腫ポドプラニン発現と血小板との凝集の有無

骨肉腫細胞株（低転移株 TE85、高肺転移株 143B）におけるポドプラニンの発現を Flowcytometry で検討した。TE85 と比較し、143B では高発現であった（図 1A，B）。そのため以下の実験では 143B を使用した。次にヒト洗浄血小板と骨肉腫細胞の凝集の有無を確認した。143B では凝集が起こることを確認し、これがポドプラニン抗体を用いることで抑制された（図 C）。

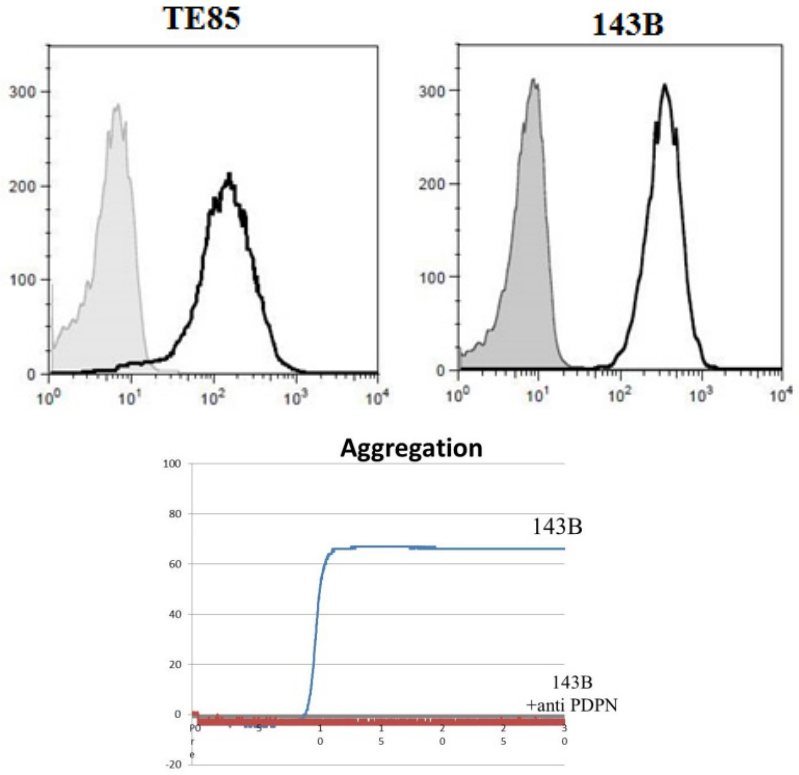


図 1. 骨肉腫ポドプラニン発現と血小板との凝集の有無

上段：骨肉腫ポドプラニン発現。下段：ヒト血小板と 143B 骨肉腫細胞との凝集。

2. 骨肉腫細胞による血小板活性化におけるサイトカイン産生と骨肉腫の移動能への影響

ヒト骨肉腫細胞高肺転移株（143B）とヒト洗浄血小板を 30 分共培養ののち、遠心して得られた上清（B）と血小板のみの上清（A）における、PF-4、TGF-β を ELISA で測定したが、有意に（B）で増加していた（図 2）。次に移動能への影響を Migration Assay で検討した。（B）を加えた群で有意（$p < 0.01$、Student's t-tests）に増加していた（図 2）。

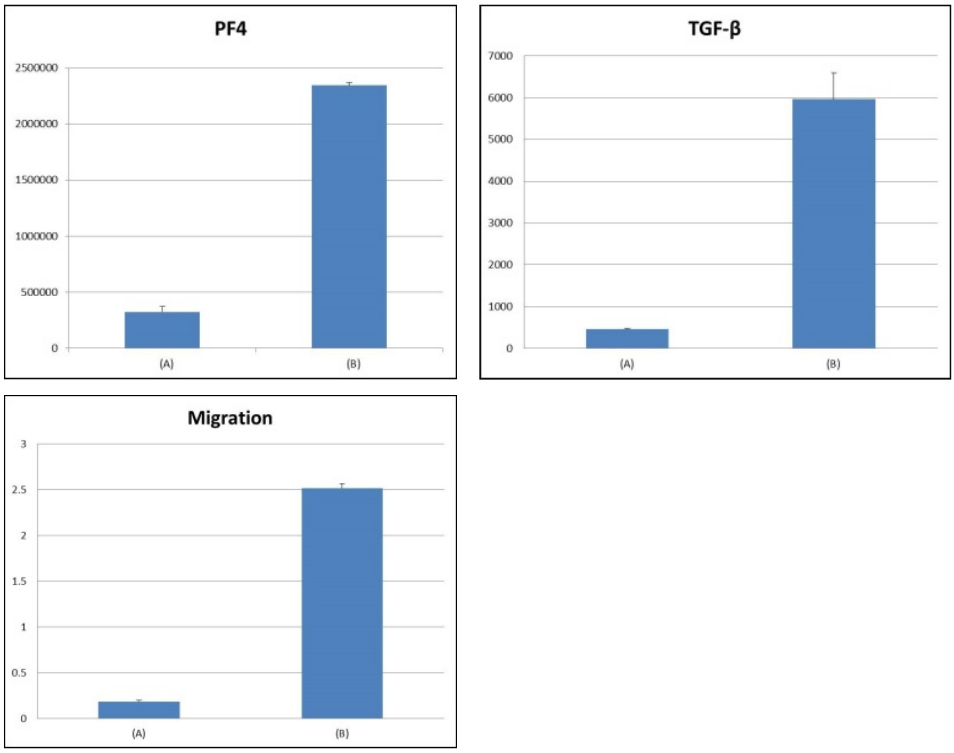


図 2. 骨肉腫細胞による血小板活性化におけるサイトカイン産生と骨肉腫の移動能への影響

上段：ヒト血小板と骨肉腫細胞の共培養におけるサイトカイン産生。

下段：その上清による骨肉腫細胞の移動の変化。

3. 血小板 CLEC-2 をターゲットにした新規治療の可能性

IgG 群と CLEC-2 抗体投与群で比較を行った。3 週での時点で、ルシフェラーゼでの蛍光強度の測定を測定し、CLEC-2 抗体投与群で低下、減少（*p < 0.05、Student's t-tests）していたことが分かった。（図 3）

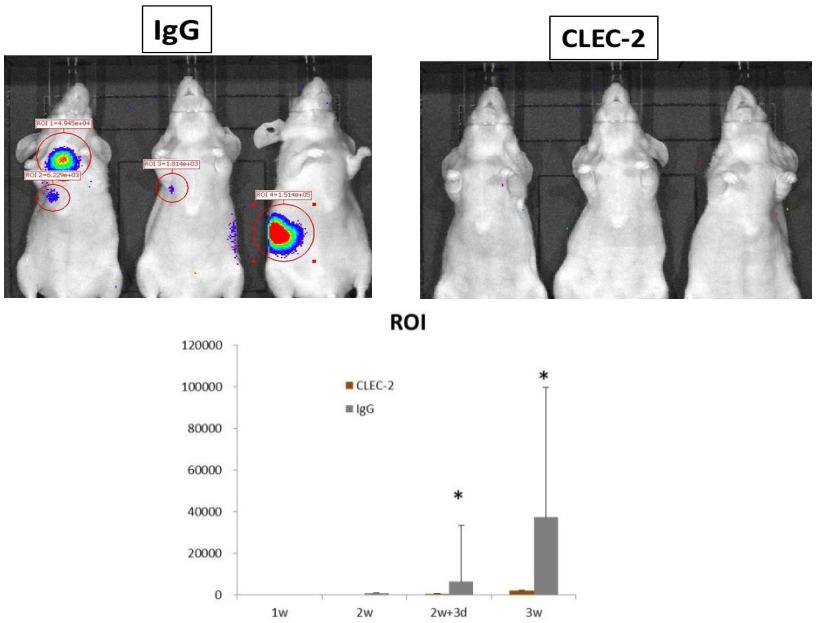


図 3. 血小板 CLEC-2 をターゲットにした新規治療の可能性

上段：IgG、抗 CLEC-2 抗体治療の効果。

下段：ルシフェラーゼの蛍光強度。

考　察

骨軟部肉腫は希少がんの一つであり、手術、化学療法の改善により生存率が上昇したが、この20年、新規抗がん剤、分子標的剤の開発はなく、予後はほぼ横ばいとなっている。ただ、骨軟部肉腫はもともと40種類以上と多く、それぞれにおいてその分子的な特徴は多様であるが、予後規定因子としての肺転移は共通しており、その機序解明が予後改善に直結する可能性が高い。血小板以前より腫瘍の転移に促進的とされていたが、近年その詳細な機序が他癌腫であるが報告されている［1，5］。また、血小板CLEC-2を阻害することで悪性黒色腫の転移抑制が報告されている［5］。本研究からは 1）骨肉腫ポドプラニンが血小板CELC-2を介した活性化、2）CLEC-2を抑制することで骨肉腫の転移を抑制する可能性、という結果が得られた。先行研究を踏まえると血小板が骨肉腫の転移に重要な役割を担っており、治療のターゲットになる可能性が高い。また、このアドバンテージとして、治療標的を血小板にしているので、①既存抗がん剤との併用、②既存の抗がん剤無効例への投与、③高齢者あるいは合併症による抗癌剤投与不能例への投与などの利点が上げられ、この研究を実用化することは、治療選択の多様性と患者予後の改善に直結する可能性が高い。今後、原発巣への効果を検討する予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である山梨大学臨床検査医学教室の井上克枝先生に感謝いたします。

文　献

1） Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. Cancer Cell. 2011;20:576-90. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.09.009.

2） Hou CH, Lin FL, Hou SM et al. Cyr61 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis of osteosarcoma by Raf-1/MEK/ERK/Elk-1/TWIST-1 signaling pathway. Mol Cancer. 2014 ;13:236. DOI: 10.1186/1476-4598-13-236.

3） Suzuki-Inoue K, Fuller GL, et al. A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. Blood. 2006;107:542-9. DOI: 10.1182/blood-2005-05-1994.

4） Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, et al. Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. J Biol Chem. 2007;282:25993-6001. DOI: 10.1074/jbc.M702327200.

5） Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:E3053-61. DOI: 10.1073/pnas.1411082111.

6） Shirai T, Inoue O, Tamura S, et al. C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. J Thromb Haemost. 2017;15:513-525. DOI: 10.1111/jth.13604.