CLEC-2/Podoplanin による血小板の癌進展機構

白井俊光*

Platelet CLEC-2 promotes hematogenous metastasis and thromboinflammation in tumor-bearing mice

Toshiaki SHIRAI

Key words: Platelets, Cancer, CLEC-2

1. はじめに

血小板は止血に必須である一方で、古くからがんの進展を増悪することが知られている¹⁾。血小板から放出された種々の生理活性物質が癌細胞の生存・遊走・血管新生・上皮間葉転換を促進し、血中循環癌細胞との凝集反応は免疫応答やシェアストレスから癌細胞を保護するとともに血管内皮への接着を促進する。

我々は血小板活性化受容体 C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) およびその生体内リガンドとして Podoplanin (PDPN) を同定し、CLEC-2/PDPN の相互作用が血栓止血を超えた様々な生理学的役割を持つことを明らかにしてきた²⁾。血栓形成においては、CLEC-2 は動脈血栓症および静脈血栓症を増悪する一方で CLEC-2 欠損マウスは出血時間を延長しないため、出血リスクの少ない新規抗血小板薬の標的分子として期待される。

興味深いことに、PDPN はリンパ管内皮などの正常細胞に加えてメラノーマ、扁平上皮癌、グリオーマなどいくつかの癌細胞上に高発現する。したがって、血小板 CLEC-2 は癌細胞 PDPN との相互作用により癌進展を増悪していると考えられる。しかしながら、遺伝的 CLEC-2 欠損マウスは出生直後致死、

血管リンパ管吻合、血小板減少など様々な表現型を示すことから、これらの影響を排除した動物モデルの作成・解析が必要である。そのため、今日まで血小板 CLEC-2 の癌進展における役割は明らかになっていない。

本研究において、我々は抗体により巨核球・血小板 CLEC-2 が欠損する現象に着目し³⁾、ラット抗マウス CLEC-2 モノクローナル抗体 2A2B10 を樹立した。抗体投与後の表現型を解析した後、PDPN 発現マウスメラノーマ B16F10 を用いて、癌進展における血小板 CLEC-2 の病態生理学役割を調査した⁴⁾。

2. 抗 CLEC-2 抗体 2A2B10 による血小板特異的 CLEC-2 欠損マウスの作成

GPVI と同様に、抗 CLEC-2 抗体は一時的な血小板減少を生じた後、CLEC-2 欠損血小板が産生される³⁾。我々はラット抗マウス CLEC-2 モノクローナル抗体 2A2B10 を樹立し、腹腔内投与後の表現型を解析した。他グループの報告と同様に 2A2B10 の単回投与は一過性の血小板減少を認め、血小板上の CLEC-2 欠損状態を 8 日間維持した (図 1A, B)。2A2B10 を 7 日毎に反復投与すると 2 回目以降は血小板減少を惹起せず (図 1A)、34 日後まで血小板 CLEC-2 欠損状態を維持した (図 1B)。この際、貧血、血小板減少、および血管・リンパ管吻合は認められなかった。

マウスでは白血球上にも CLEC-2 が発現するため、2A2B10 投与後の白血球上の CLEC-2 の発現量の変

*責任者連絡先:

山梨大学医学部臨床検査医学講座
〒409-3898 山梨県中央市下河東 1110
Tel: 055-273-9884
E-mail: tshirai@yamanashi.ac.jp

図1 抗 CLEC-2 抗体 2A2B10 による血小板特異的 CLEC-2 KO マウスの作成

(A) 野生型 C57BL/6 マウスに Control rat IgG あるいは 2A2B10 (8 mg/kg, i.p.) を投与した時の血小板数の変動. (B) Flow cytometry 法による血小板 CLEC-2 発現量の定量. (C) 2A2B10 投与後の白血球上の CLEC-2 発現量. (D) 2A2B10 の中和活性の解析. Control rat IgG あるいは 2A2B10 と共培養された好中球に対するリコンビナント PDPN 結合量を Flow cytometry 法で測定した.

化を Flow cytometry 法で解析した。NK 細胞, B 細胞, マクロファージ, 好中球すべての細胞において, 2A2B10 投与による CLEC-2 発現量の低下は認められなかった (図 1C)。さらに, 好中球 CLEC-2 に 2A2B10 を結合させた後にリコンビナントマウス PDPN が結合するか Flow cytometry 法で解析した所, 2A2B10 は CLEC-2/PDPN 結合量を抑制しなかった (図 1D)。したがって 2A2B10 に中和活性は無い事が明らかになった。

以上の結果より, 2A2B10 は遺伝的 CLEC-2 欠損マウスに認められる表現型を示すこと無く, 後天的に血小板 CLEC-2 を特異的に欠損させた。

3. CLEC-2 は血行性転移を促進する

本研究では PDPN を発現するマウスメラノーマ細胞 B16F10 を用いる事にした。まず我々は血行性転移に対する CLEC-2 の機能を明らかにするため, GFP をトランスフェクションした B16F10 (B16F10-GFP) を尾静脈より注射し実験的肺転移モデルを作成した (図 2A)。移植時の血小板数は血行性転移に決定的な影響を与えるため, 2A2B10 抗体投与 4 日後の時点で細胞を注射した。癌細胞移植 14 日後, 肺 GFP 蛍光強度を IVIS により測定した所, 2A2B10 群は Control rat IgG 群に比べて有意に GFP 蛍光強度を減弱した (図 2B)。肺の重量も同様に 2A2B10 投与群で有意に低下していた (図 2C)。B16F10-GFP を右側腹部に皮下移植し, 21 日後の耳静脈の血流を観察し血中循環癌細胞数を測定したところ, 実験的肺転移モデルと一致して 2A2B10 群では有意に血中循環癌細胞が減少していた (図 2D)。従って, 血小板 CLEC-2 は B16F10 の血行性転移を促進することが明らかになった。

4. CLEC-2 は *in vivo* における腫瘍増殖を抑制しない

次に我々は腫瘍増殖について調査した。まず *in vitro* において B16F10 とマウス洗浄血小板を共培養し, 48 時間後の細胞数を測定した。野生型マウスあるいは Control rat IgG 投与マウス由来の洗浄血小板

の添加により, 血小板濃度依存的に B16F10 細胞数が増加した (図 3A, B)。一方, 遺伝的 CLEC-2 欠損マウスあるいは 2A2B10 投与マウス由来の洗浄血小板では細胞増殖促進効果が消失した。次に, 血小板活性化上清 (図 3C) あるいはリコンビナント mCLEC-2-rFc (図 3D) を B16F10 に添加すると, 血小板活性化上清は細胞増殖を促進したが, mCLEC-2-rFc では変化がなかった。すなわち, B16F10 による CLEC-2 依存的な血小板活性化が増殖因子など種々の生理活性物質の放出を誘導することによって細胞増殖が促進されることが明らかになった。

そこで我々は, マウスの右腹側部に B16F10 を皮下移植して経時的に腫瘍体積を測定した (図 3E)。その結果, *in vivo* では 2A2B10 群は腫瘍増殖を抑制しなかった (図 3F)。

5. CLEC-2 は腫瘍内血栓形成を増悪する

2A2B10 投与マウスが腫瘍増殖を抑制しない原因を探索するため, 我々は移植 21 日後の腫瘍の免疫組織学的解析を行った。腫瘍血管 (CD34) および血小板 (CD41) とフィブリノゲンの沈着を観察した所 (図 4A), 2A2B10 投与群では腫瘍血管密度には変化は認められなかった (図 4B)。

しかしながら, 2A2B10 群では腫瘍内にフィブリノゲンが沈着している血管の割合が有意に低下していた (図 4A, C)。腫瘍ライセートを用いたウエスタンブロッティング法では, 腫瘍内に沈着した血小板が 2A2B10 群で有意に減少していた (図 4D)。次に, 腫瘍摘出前に FITC 標識デキストランを投与し, 血液循環が維持されている機能性血管の割合を解析した。血栓形成とは反対に, 2A2B10 群は機能性血管の割合が Control rat IgG 群に比べて有意に増加していた (図 4E)。

以上の結果から, 2A2B10 投与マウスが腫瘍増殖を抑制できなかった理由として, 血小板 CLEC-2 欠損により腫瘍内の血栓形成が抑制されて機能性血管が増加することにより, 腫瘍への栄養・酸素の供給が改善した可能性が示唆された。

図2 CLEC-2 除去は血行性転移を抑制する

(A) 実験的肺転移モデルの概要. 移植 14 日後の肺における B16F10-GFP の蛍光強度を IVIS により測定し (B), 同時に肺の重量を測定した (C). ** $P < 0.01$ (Student's t-test) (D) B16F10-GFP を皮下移植した 21 日後, 耳静脈の血流を蛍光顕微鏡下で撮影し, 10 分間 GFP 陽性細胞数をカウントした. Scale bar = 50 μm . * $P < 0.05$ (Student's t-test).

6. CLEC-2 は Thromboinflammation の増悪により予後を不良にする

2A2B10 投与マウスは実験的肺転移および腫瘍内の血栓形成を抑制したが, 腫瘍増殖は抑制しなかった. これらの影響が予後改善に寄与するか皮下移植後に生存解析を行った. 興味深いことに, CLEC-2 欠損状態を維持できる 30 日間において, 2A2B10 群は Control rat IgG 群に比べて生存率が有意に増加した (図 5A).

癌患者において, 転移を伴う癌進展に続く 2 番目の死因は癌関連血栓症である⁵⁾. 2A2B10 投与マウスが腫瘍内の血栓形成を抑制していたことから, 我々は CLEC-2 が全身性に血栓形成を増悪している可能性に着目した. 腫瘍移植 21 日後, 肺の血栓形成を免疫組織学的に解析すると, 2A2B10 群は Control rat IgG 群と比較してフィブリノゲンの沈着が有意に減少していた (図 5B). さらに, 2A2B10 群は炎症性サイトカイン IL-1 β , IL-6 の血中濃度が低下し (図 5C), 大腿四頭筋重量の減少 (図 5D) および貧血 (図 5E)

図3 CLEC-2 除去は *in vivo* における腫瘍増殖を抑制しない

(A–D) *In vitro* における B16F10 の細胞増殖. B16F10 と遺伝的 CLEC-2 KO マウス (A) あるいは 2A2B10 抗体投与マウス (B) の洗浄血小板を添加し, 48 時間後の細胞数をカウントした. (C) 血小板活性化上清 (APS) による細胞増殖促進効果. (D) リコンビナント mCLEC-2-rFc2 添加による細胞増殖促進効果. *** $P < 0.001$, (Dunnett's t-test). (E) 皮下移植後の B16F10 腫瘍体積の経時的解析.

の程度が Control rat IgG 群と比較して有意に軽微だった. 以上の結果から, CLEC-2/PDPN 相互作用による血栓形成が慢性炎症を増悪し, 癌関連血栓症および癌悪液質を増悪する可能性が示唆された.

7. おわりに

癌細胞において PDPN は遊走, 浸潤, 転移を促進する分子として注目されてきた. 一方 CLEC-2 は適切な実験モデルが構築されておらず, その役割は不明であった. 本研究は CLEC-2 を標的とした癌研究

図4 CLEC-2 除去は腫瘍内の血栓形成を抑制し血液循環を改善させる

(A) 移植 21 日後の腫瘍切片における血管 (青), フィブリンノーゲン (緑), 血小板 (赤). Scale bar = 50 μ m. (B) 腫瘍血管密度の定量. (C) フィブリンノーゲン (マゼンタ) の詰まった腫瘍血管 (緑) の定量解析. * $P < 0.05$ (Student's t-test). (D) 移植 21 日後の腫瘍ライセートにおける血小板 (CD41) の半定量. タンパク量を β -actin で補正した. * $P < 0.05$ (Student's t-test). (E) 腫瘍内の機能性血管の割合. FITC 標識デキストラン (緑) を灌流し, 血液循環のある血管 (緑+マゼンタ) の割合を解析した. *** $P < 0.001$ (Student's t-test).

の初めての報告である.

グリオーマは癌関連血栓症を高頻度で引き起こす癌種の 1 つである. グリオーマ患者の組織学的解析

から, PDPN 発現が腫瘍内血小板凝集塊に関与しており, PDPN 発現が VTE 発症リスクを増強する事が報告されている⁶⁾. さらに, マウスモデルにおいて

図5 CLEC-2 除去は Thromboinflammation を抑制し、予後を改善する

(A) 皮下移植後の生存解析。P 値はログランク検定により算出した。(B-E) 癌悪液質に関する解析。腫瘍移植 21 日後にサクリファイスし、肺切片におけるフィブリノゲンの沈着 (B)、血漿中 IL-1 β および IL-6 濃度 (C)、大腿四頭筋重量 (D)、血液学的解析 (E) を行った。* $P < 0.05$ (Student's t-test)

グリオーマ細胞由来の PDPN が腫瘍内の血小板凝集を増悪している事が報告された⁷⁾。これらは本研究と一致する結果であり、CLEC-2 を標的とした新規抗血小板剤はグリオーマ患者の癌関連血栓症の予防・治療として有益である可能性が高い。同時に、機能性血管の増加は腫瘍深部への抗がん剤の輸送の観点からも有効かもしれない。

本研究で明らかにされていない点も多い。癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts: CAFs) や癌関連マクロファージ (Tumor-associated macrophages: TAMs) などの癌間質細胞にも PDPN が発現することが知られているが、これらの PDPN 発現癌間質細胞に対する血小板 CLEC-2 の機能は全くわかっていない。今後も精力的に研究を続け、癌にお

ける CLEC-2 の病態生理学的役割について明らかにしていきたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご協力頂いた著者の皆様、また実験をサポートしていただいた中澤久一郎様、小松千亜紀様、福田初葉様、大竹志門先生に感謝いたします。また、本研究は最先端・次世代研究支援プログラム (LS052) の助成を受けて行われました。感謝いたします。

著者の利益相反 (COI) の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業等との利益相反なし

文献

- 1) Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V, Sood AK: The platelet lifeline to cancer: Challenges and opportunities. *Cancer Cell* **33**: 965–983, 2018.
- 2) Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, Shirai T, Osada M, Inoue O, Ozaki Y: Platelet CLEC-2: Roles beyond hemostasis. *Semin Thromb Hemost* **44**: 126–134, 2018.
- 3) May F, Hagedorn I, Pleines I, Bender M, Vogtle T, Eble J, Elvers M, Nieswandt B: CLEC-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. *Blood* **114**: 3464–3472, 2009.
- 4) Shirai T, Inoue O, Tamura S, Tsukiji N, Sasaki T, Endo H, Satoh K, Osada M, Sato-Uchida H, Fujii H, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K: C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. *J Thromb Haemost* **15**: 513–525, 2017.
- 5) Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH: Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost* **5**: 632–634, 2007.
- 6) Riedl J, Preusser M, Nazari PM, Posch F, Panzer S, Marosi C, Birner P, Thaler J, Brostjan C, Lotsch D, Berger W, Hainfellner JA, Pabinger I, Ay C: Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism. *Blood* **129**: 1831–1839, 2017.
- 7) Costa B, Eisemann T, Strelau J, Spaan I, Korshunov A, Liu HK, Bugert P, Angel P, Peterziel H: Intratumoral platelet aggregate formation in a murine preclinical glioma model depends on podoplanin expression on tumor cells. *Blood Adv* **3**: 1092–1102, 2019.