

血小板凝集因子 Aggrus の分子生物学的解析と
その臨床応用

加藤幸成

<目次>

序論	2
第1章 血小板凝集因子 Aggrus の遺伝子クローニングと分子生物学的解析	8
第2章 ヒト腫瘍における Aggrus の発現	24
総括	44
参考文献	45
謝辞	49

序論

癌が血管に侵入して血行性の転移をとる場合、血管内皮細胞表面に接着し、血管外へ浸潤する(Fig. 1)。この血管内皮への接着の際に、多くの場合、血小板凝集が見られることが知られている(1)。Tsuruo らにより、マウス結腸癌細胞株 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 細胞が取得された(2)(Fig. 2)。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(3)。8F11 抗体は 44kDa の糖タンパク質である Aggrus (gp44)を認識した。*in vitro* の実験で、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 細胞による血小板凝集が阻害された(Fig. 3)。*in vivo* の実験では、NL-17 の実験的肺転移が 8F11 抗体の投与により阻害された(4)(Fig. 4)。このことから、NL-17 細胞は血小板凝集因子 Aggrus によりマウスの血小板を凝集させ、その結果肺転移を起こすことが示唆された。その後、Toyoshima らにより、二つのアフィニティーカラム(8F11 抗体カラムと WGA カラム)によって Aggrus タンパクが精製された(5)。精製された Aggrus は血漿成分非存在下で、濃度依存的にマウスの血小板凝集を引き起こした。さらにこの凝集反応は 8F11 抗体によって完全に阻害された。様々な酵素処理により、Aggrus は O-結合型糖鎖が多く付加されており、Aggrus のシアル酸が NL-17 細胞による血小板凝集や NL-17 細胞の実験的転移に重要な役割をしていることも示唆された。

近年、他のグループでも Aggrus と分子量、糖鎖の付加、組織分布の似通った分子として、T1 α /podoplanin およびそのホモログの研究がなされている。Nose らは、マウス骨芽細胞(MC3T3-E1)に TPA を処理すると、OTS-8 という遺伝子の発現が誘導されてくることを報告した(6)。OTS-8 はマウスの肺に高発現しており、26kDa の糖タンパク質であるが、分泌タンパクであると予想された。さらに、Farr らにより、末梢リンパ節の T 細胞依存領域に存在する I 型胸腺上皮細胞と間質細胞に、gp38 という膜タンパク質が発現していることが報告された(7)。gp38 は典型的な I 型膜貫通型タンパクで、172 アミノ酸からなる 38kDa の糖タンパク質である。gp38 には多くの O-結合型糖鎖と 1 個の N-結合型糖鎖が付加されている(60 番目の Asn)と予想されており、さらに PKA や PKC によるリン酸化部位を C 末端(9 アミノ酸)に有している。その後、Wetterwald らにより、gp38 のラットホモログが、骨芽細胞系の新しいマーカー(E11 antigen)として報告された(8)。E11 antigen は骨、肺、脳、皮膚にも mRNA の発現が確認された。さらに、Williams らにより、gp38 のラットホモログである T1 α という分子が肺の I 型肺胞上皮細胞上に発現しており、これは II 型の肺胞上皮細胞には発現していないことが示された(9)。

T1 α は肺胞上皮幹細胞から I 型肺胞上皮細胞への分化とともに発現されてくることがわかった。さらに Breiteneder らにより、gp38 のラットホモログである podoplanin という 43kDa の糖タンパク質が、腎の糸球体上皮細胞 (podocyte) に発現しており、腎の微小変化群のラットモデルで、発現が落ちることも報告された (10)。一方、Zimmer らにより、type-I Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞に、gp38 のイヌホモログである gp40 が発現していることが報告された (11)。gp40 は 40kDa の sialoglycoprotein であり、O-結合型糖鎖が豊富で、N-結合型糖鎖の付加部位はない。gp40 はイヌの肺、腸、腎、脳、心臓に発現している。さらに同グループにより、gp38 のヒトホモログとして、gp36 が発見された (12)。gp36 はヒト肺、胎盤、骨格筋に高発現し、脳、腎、肝での発現量は少ない。また、マウスホモログとして、gp38 と 5 アミノ酸のみ異なる gp38P が Boucherot らにより報告された (13)。

これらの多くの研究はすべて同一の遺伝子あるいはそのホモログに関する研究であるが、近年、特に T1 α と podoplanin と名付けられた分子に関する研究が盛んである。Ramirez らにより T1 α のノックアウトマウスが作製されたが、T1 α のノックアウトマウスは呼吸不全により生後すぐに死亡した (14)。さらに、Schacht らにより、T1 α のノックアウトマウスではリンパ管の形成不全や先天的なリンパ水腫が見られることが報告された (15)。T1 α は I 型肺胞上皮細胞に選択的に発現していることから、II 型肺胞上皮細胞と区別することができる選択的マーカーとして、近年、多くの研究グループに利用されている (9, 16)。一方、podoplanin はリンパ管内皮細胞に反応し、血管内皮細胞に反応しないことから、リンパ管を血管と区別する特異的マーカーとして繁用されている (17-19)。癌の転移だけでなく、様々な臓器の炎症性疾患、糸球体腎症、腎移植においてリンパ管の増生が報告されており、podoplanin というリンパ管マーカーの発見により、その詳細な研究が可能となった。本研究では、T1 α /podoplanin というタンパク質が、Aggrus と同一の分子であることを発見し、Aggrus 遺伝子のクローニングに成功した (20)。さらに、Aggrus の分子生物学的解析により、Aggrus の血小板凝集活性の活性中心の探索を行った。Aggrus/T1 α /podoplanin はリンパ管、I 型肺胞上皮細胞の特異的マーカーとして繁用されているが、本研究ではヒト腫瘍においても、腫瘍マーカーとして、さらに癌の分子標的療法のターゲットとしての可能性を検討した。

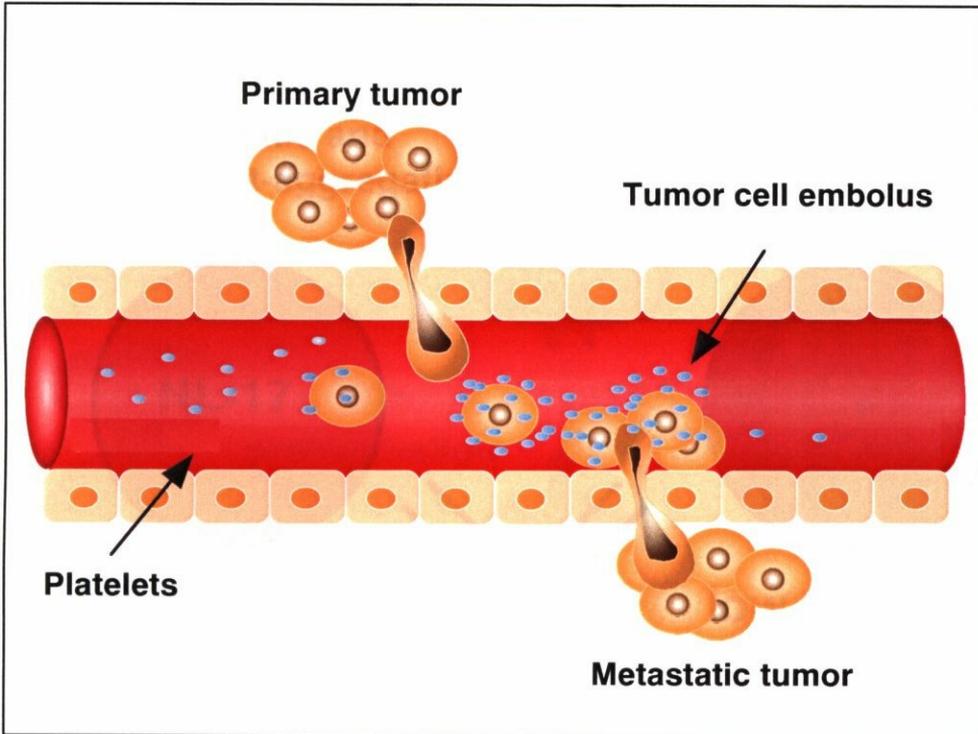


Fig. 1. Successful metastasis of cancer cells by interaction with platelet.

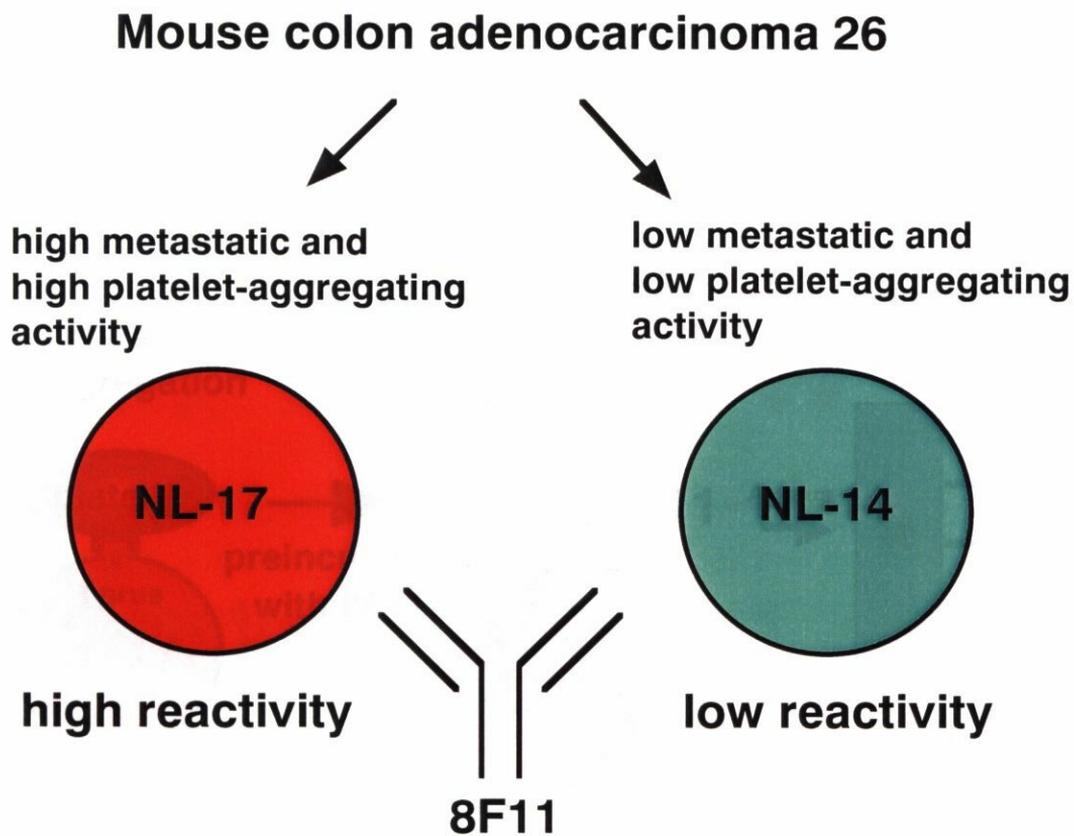


Fig. 2. Establishment of metastatic variants from mouse colon adenocarcinoma. NL-17 cells showed high platelet-aggregating activity and greater lung-metastasizing potential, while NL-14 cells showed low platelet-aggregating activity and smaller lung-metastasizing potential. 8F11 highly reacted with NL-17 cells, not with NL-14 cells.

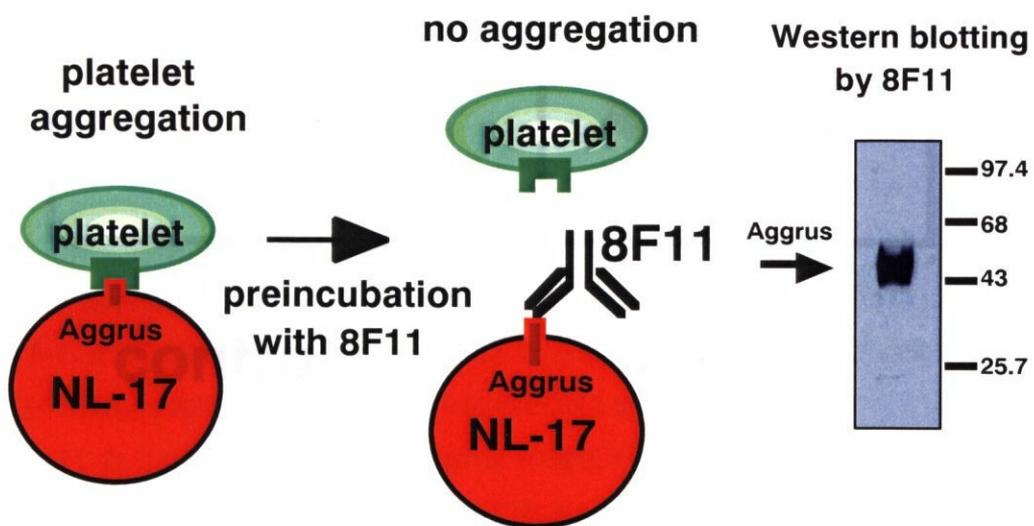


Fig. 3. Suppression of NL-17 induced platelet aggregation by 8F11. 8F11 inhibited platelet aggregation by NL-17 cells and recognized 44 kDa sialoglycoprotein (gp44) on NL-17 cells.

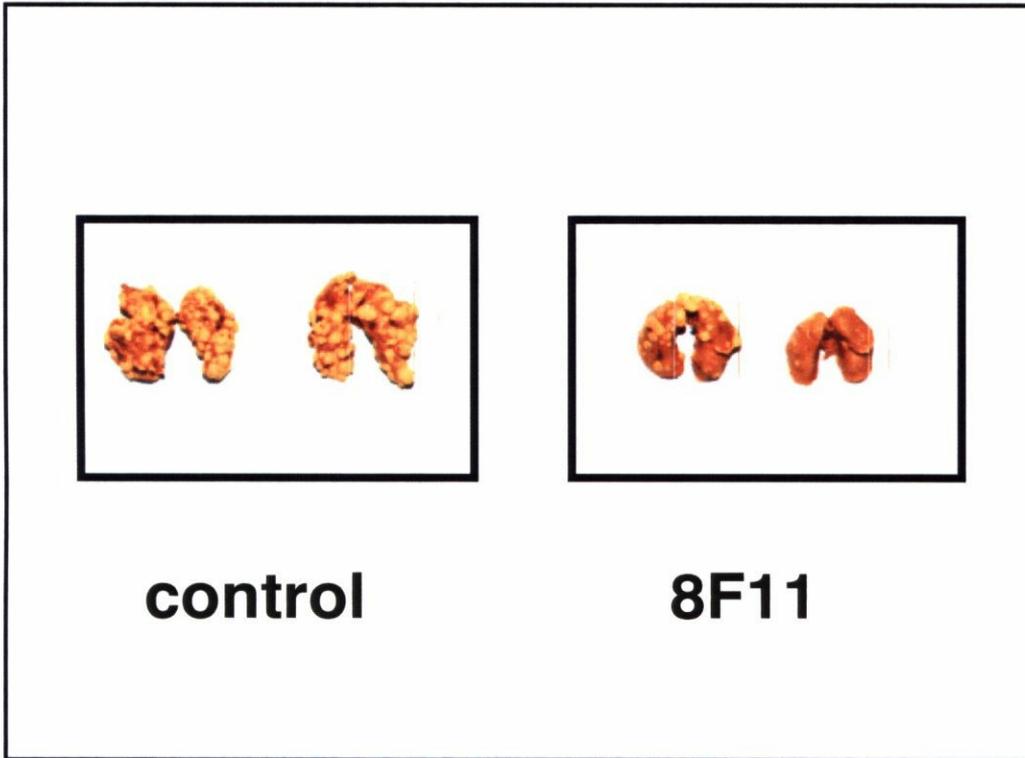


Fig. 4. Suppression of pulmonary metastasis of NL-17 by 8F11. NL-17 cells were harvested and resuspended in HBSS supplemented with 1% BALB/c serum. The mice were given i.v. injections of 0.2 ml (2.5×10^4 cells) of tumor suspension via the lateral tail vein. 8F11 (500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$; right panel) was given i.v. 10 min before the tumor inoculation. Lung metastasis was examined on day 14 after the tumor inoculation.

第 1 章 血小板凝集因子 Aggrus の遺伝子クローニングと分子生物学的解析

1-1 目的

本章では、マウス結腸癌細胞株 NL-17 細胞から、血小板凝集因子 Aggrus の遺伝子クローニングを行い、その活性部位を分子生物学的手法で解析することを目的とした。Toyoshima らの研究から、Aggrus (gp44)には O-結合型糖鎖が多く付加されており、精製およびアミノ酸シーケンスの決定が困難であった。そこで、本研究では、マウス Aggrus と組織分布、分子量、分子の性質の類似性のある膜タンパクの検索を行い、それらの分子が抗 Aggrus 抗体である 8F11 によって認識されるかどうかを検討することにした。

1-2 試薬および方法

1-2-1 Plasmids, siRNA, 抗体

マウスの aggrus の遺伝子 (GenBank accession No. AJ297944, AJ250246) は、NL-17 細胞から RT-PCR により取得した (13, 21)。ヒト aggrus の遺伝子 (GenBank accession No. AF030428, AJ225022) は、正常ヒト肺の cDNA library (コスモ・バイオ) から PCR により取得した (12, 21)。増幅した aggrus の遺伝子は、pcDNA3 vector (Invitrogen) にサブクローニングし、FLAG タグを C 末端に付加した。aggrus 遺伝子の point mutation は QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いて行った。マウス aggrus の deletion mutant は pET-21a vector (Novagen) に組み込みこんだ。siRNA はマウス aggrus/T1 α の配列からデザインし、その配列として、マウス aggrus 遺伝子の 180-198 番目の 5'-UGAAUCUACUGGCAAGGCA-3' と 5'-UGCCUUGCCAGUAGA UUCA-3' を用いた。コントロールの siRNA は Qiagen から購入した。

ラットモノクローナル抗体である、8F11 抗体 (抗マウス Aggrus 抗体) は腹水より ProteinG (Zymed) により精製した (5)。抗ヒト Aggrus ポロクローナル抗体 (TT679) は、ヒト Aggrus の 38-51 番目のアミノペプチドの N 末端にシステインを付加した合成ペプチド (CEGGVAMPGAEDDVV) をラビットに免疫し、採取した血清をペプチドに対するアフィニティーカラムで精製した。コントロールの rat IgG、抗 FLAG-M2 抗体、抗 β -actin 抗体 は Sigma から購入した。

1-2-2 細胞培養

Chinese hamster ovary (CHO)、mouse colon adenocarcinoma NL-14, NL-17、

mouse lymph node stromal CA-12、mouse osteoblastic MC3T3-E1、thioglycolate-elicited mouse peritoneal macrophages は、10%の非働化した Fetal Bovine Serum (Biocell)、2 μ M L-glutamine (Invitrogen)、100 μ g/ml kanamycin を添加した RPMI 培地中で、5% CO₂ incubator 内で 37°C で培養した。

1-2-3 RT-PCR、PCR

NL-17 細胞より、RNeasy Mini kit (Qiagen)を用いて total RNA を抽出し、5 μ g の total RNA を鋳型として SuperScript III First-Strand synthesis system for RT-PCR system (Invitrogen)を用いて cDNA を合成した。HotStartTaq DNA polymerase (Qiagen)と以下の primer set を用いて、Aggrus 遺伝子の全長を PCR にて増幅した。マウス Aggrus sense (5'-CTCAAGCTTCAAGATGTGGACCGTGCCAGTG-3'), マウス Aggrus antisense (5'-GAGGAATTTCGGGCGAGAACCITCCAGAAATC-3'), ヒト Aggrus sense (5'-TGTGGAAGGTGTCAGCTCTG-3'), ヒト Aggrus antisense (5'-TTAGGGCGAGTACCTTCCCG-3'), マウス β -actin sense (5'-GATATCGCTGCGCTGGTCGTCGAC-3'), マウス β -actin antisense (5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3')をそれぞれ用いた。PCR の温度条件は、95°C 15min x 1cycle, 94°C 30sec, 55°C 40sec, 72°C 1min x 35cycle, 72°C 10min x 1cycle にて行った。増幅された PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にて分離・精製を行い、p3T vector (MoBiTec)にサブクローニングを行った。LB アンピシリン溶液にてコロニーを培養し、QIAmini DNA prep kit (Qiagen)を用いてプラスミド DNA の抽出を行った。インサートの有無とオリエンテーション(インサートの入った方向)を制限酵素 *Hind* III と *Not* I の切断により決定した。適切な長さのインサートの入ったクローンに関して、塩基配列の確認を行った。塩基配列の確認は Dye Terminator Cycle Sequencing Kit と ABI prism 310 (perkin-Elmer)を用いた。

1-2-4 遺伝子導入

大腸菌への遺伝子導入は、electroporation 法 (EquiBio)を用いて行った。CHO 細胞への遺伝子導入は electroporation 法 (BTX ElectroSquarePorator T820 ELECTROPORATION SYSTEM)、あるいは LipofectAMINE reagent (Invitrogen)を用いて、添付のプロトコールに従って行った。以下、CHO 細胞への遺伝子導入について簡単に方法を示す。electroporation 法では、細胞数は 1×10^5 cells と 2 μ g の DNA を 10%FBS/RPMI に suspend し、final 800 μ l に調整し専用のキュベット (0.4 cm) に入れ、electroporation を行った。30 秒以内に、予め温めた 10 ml の medium (1 mg/ml G418

入りの 10%FBS/RPMI に浮遊させ、96 well plate に 400 cells/well、200 cells/well の割合で培養した。LipofectAMINE を用いた方法では、まず CHO 細胞を 50-80%の semiconfluent の状態で 6well plate に培養し、12 時間後、1.5 μg の DNA を 100 μl の無血清培地（抗生物質なし）に入れ、やさしく混ぜた。同時に 20 μl の LipofectAMINE を 100 μl の無血清培地に入れ、LipofectAMINE 溶液を調整した。次に、DNA 溶液と LipofectAMINE 溶液を室温で 30 分間混ぜ、0.6ml の serum free medium を各 tube に加え、あらかじめ 0.8ml の serum free medium に培地交換した 6 well plate に全量を入れた（計 1.6ml になる）。3 時間、incubation を行い、20%FBS/RPMI を 1.6ml 加えた。さらに 21 時間後に培地を 10%FBS/RPMI(ここからは抗生物質を入れてもよい)に交換し、さらに 24 時間培養した。その後、1 mg/ml の G418 (geneticin; Sigma-Aldrich)を添加した 10%FBS/RPMI で培養した。

siRNA の導入は LipofectAMINE 2000 reagent を用いた。

1-2-5 Western-blot 法、免疫沈降

<試薬の調整>

lysis buffer;

25 mM Tris (pH 7.4), 50 mM NaCl, 0.5% Na deoxycholate, 2% NP-40, 0.2% SDS, 1 mM PMSF, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin

washing buffer (免疫沈降用);

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% sodium azide (pH8.3)

blocking buffer;

1% BSA in PBS

washing buffer (western-blot 用) ;

0.05% Tween 20 in PBS

2 x sample buffer;

25 mM Tris-HCl (pH 6.5), 5% glycerol, 0.4% SDS, 5% 2-Mercapto-ethanol, 0.05% bromophenol blue (BPB)

running buffer;

25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glycine, 0.1% SDS

細胞(CHO 親株、CHO の発現株)を PBS で 3 回洗浄後、lysis buffer で可溶化し、ProteinG (Zymed)と精製抗体 (8F11, M2, normal rat IgG)の複合体に加えた。氷上で 1 時間反応させた後、washing buffer (免疫沈降用) で 3 回洗い、10 μl の 2 x sample buffer を加

え、100℃で5分煮沸した。遠心して、上清 10 μ l を 10% constant gel に apply し、running buffer を用いて、20mA で2時間電気泳動した。その後、PVDF 膜に転写し、blocking buffer で室温、1時間 blocking した。その後、blocking buffer で 10 μ g/ml に調整した各々の抗体を、室温で1時間反応させた。washing buffer (western-blot 用) で洗った後、blocking buffer で 1/1,000 に希釈した HRP-labeled anti-Rat IgG (DakoCytomation) を1時間反応させた。washing buffer (western-blot 用) で洗った後、ECL (Amersham Pharmacia Biotech) で発色させ、scientific imaging film に露光させた。

1-2-6 ELISA

マウス Aggrus の 39-47 番目のアミノ酸に相当するペプチド、すなわち wild type である DGMVPPGIEC、その変異ペプチドである DGAVPPGIEC (M41A), DGMAPPGIEC (V42A), DGMVAPGIEC (P43A), DGMVPAGIEC (P44A) を合成した。これらの合成ペプチドを、PBS で 1 μ g/ml の濃度に溶解し、96 well ELISA plate (MaxiSorp; Nunc) に固相化した。1% BSA/PBS で1時間、室温で blocking 後、1% BSA /PBS で 1 μ g/ml に調整した 8F11 抗体、normal rat IgG を1時間、室温で反応させた。0.05% Tween 20/PBS で3回洗浄後、1% BSA /PBS で 1/1,000 に希釈した HRP-labeled anti-Rat IgG (DakoCytomation) を1時間反応させた。0.05% Tween 20/PBS で3回洗浄後、蒸留水で1回洗浄し、0.03% H₂O₂ を添加した ABTS 溶液で発色後、405 nm の吸光度を microplate reader (Bio-Rad) で測定した。

1-2-7 Flow cytometry

CHO 親株およびマウス Aggrus 遺伝子を CHO 細胞に発現させた株である CHO/mAGR を 37℃ でトリプシン処理し、PBS で1回洗浄後、PBS で 1 μ g/ml に調整した 8F11 抗体、normal rat IgG を 100 μ l、1時間室温で反応させた。PBS で1回洗浄後、PBS で 1/200 に希釈した anti-rat IgG-FITC (Cappel) を 50 μ l ずつ加え、室温で 30 分間、遮光して反応させた。PBS で1回洗浄後、FACSCalibur (Becton Dickinson) で測定した。

1-2-8 血小板凝集の測定

血小板凝集の測定は、既報に従って行った (5)。血小板凝集計 (NKK HEMA TRACER 1) のキュベットに platelet rich plasma (PRP) を 200 μ l 入れ、PBS で洗浄後 PBS で調整した CHO 親株、CHO の各種遺伝子発現株 (2×10^7 cells/ml) を 10 μ l 添加し、濁度の変化を測定した。

1-2-9 実験的肺転移

CHO 親株およびヒト Aggrus 遺伝子を CHO 細胞に発現させた株である CHO/hAGR を、トリプシン処理で dish より回収し、PBS で 2.5×10^6 cells/ml に調整し、 $200 \mu\text{l}/\text{mouse}$ で 6 週齢の Balb/c ノードマウスの尾静脈に投与した。投与から 19 日後に、解剖を行い、肺転移の観察を行った。

1-3 結果

1-3-1 血小板凝集因子 Aggrus の遺伝子クローニング

Aggrus は、マウス結腸癌細胞の NL-17 細胞から発見されたが、その他に Aggrus を発現している細胞の検索を行ったところ、マウスの間質細胞 CA-12 細胞、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞、マクロファージに、Aggrus タンパクの発現が見られた(Fig. 5A)。近年、他の研究グループより単離された、T1 α というタンパク質が、その発現部位、発現細胞、分子の性質から、Aggrus と同一の分子ではないかと考え、以下の実験でその証明を行った(9)。まず、NL-17 細胞から単離したマウス T1 α 遺伝子、すなわちマウス Aggrus 遺伝子を CHO 細胞に発現させた株 CHO/mAGR を作製したところ、8F11 抗体によって認識されることを Flow cytometry で確認した(Fig. 5B)。さらに、マウス T1 α が 8F11 抗体によって認識されることを、免疫沈降および western-blot 法で確認した(Fig. 5C)。lane 1,2 は、CHO, CHO/mAGR の lysate をそれぞれ 8F11 抗体で免疫沈降したものに対し、8F11 抗体による western-blot 法を行った結果、lane1 に 44kDa の Aggrus タンパクが検出された。CHO/mAGR の Aggrus タンパクの C 末端には FLAG ペプチドを付加しており、その FLAG ペプチドに対する M2 抗体によって免疫沈降を行ったところ、同様に 44kDa の Aggrus タンパクが検出された。次に、Aggrus の 180-198 番目残基に対する siRNA を NL-17 細胞に導入したところ、Aggrus の発現がノックダウンされることが示された(Fig. 5D)。さらに、Aggrus タンパクの高発現株 NL-17 細胞と低発現株 NL-14 細胞について、RT-PCR で Aggrus の発現の比較を行ったところ、NL-17 細胞では NL-14 細胞に比べ Aggrus の発現が高いことを確認した(Fig. 5E)。以上より、T1 α と Aggrus が同一の分子であることが証明され、NL-17 細胞からの Aggrus 遺伝子の単離に成功した。さらに、ヒトでの Aggrus の発現を調べるため、ヒト肺の cDNA ライブラリーより、ヒト Aggrus の遺伝子を単離した。

1-3-2 血小板凝集因子 Aggrus による血小板凝集

Toyoshima らの研究より、NL-17 細胞から精製されたマウス Aggrus はマウスの血小板凝集を引き起こすことが知られており、リコンビナントのマウス Aggrus あるいはヒト Aggrus による血小板凝集能の検討を行なった。マウスの多血小板血漿 platelet rich plasma (PRP)を分離し、CHO 親株、マウス Aggrus の発現株である CHO/mAGR、ヒト Aggrus の発現株である CHO/hAGR を加えて血小板凝集能を検討した(Fig. 6A)。その結果、マウスの血小板に対し、マウス Aggrus が凝集を起こしただけでなく、ヒト Aggrus も凝集を引き起こした。さらに、ヒトの PRP を分離し、同様に血小板凝集反応をべたとこ

ろ、ヒト Aggrus だけでなく、マウス Aggrus もヒト血小板に対して凝集反応を引き起こした(Fig. 6B)。このマウス Aggrus による血小板凝集は 8F11 抗体により完全に抑制された(Fig. 6C)。さらに、マウス Aggrus がマウスの洗浄血小板 washed platelet を凝集させるかどうかを調べた結果、マウス Aggrus によって、PRP の場合と同様に血小板凝集が引き起こされ、Aggrus による血小板凝集は血漿成分に依存しないことが示された(Fig. 6D)。以上の結果より、マウスおよびヒト Aggrus が血小板凝集能を有することが示された。

1-3-3 血小板凝集因子 Aggrus による実験的肺転移の促進

ヒト Aggrus の発現株の実験的肺転移の検討を行った。ヌードマウスの尾静脈に CHO の親株、CHO/hAGR を静注し、19 日後に肺転移を調べたところ、親株ではほとんど転移が見られないが、CHO/hAGR では多くの転移結節が見られた(Fig. 7)。よって、Aggrus は血小板を凝集させ、転移の形成に重要な役割を果たしていることが示された。

1-3-4 血小板凝集因子 Aggrus の活性部位の同定

8F11 抗体はマウス Aggrus の血小板凝集を阻害することから、8F11 抗体のエピトープを調べることにより、マウス Aggrus の活性部位を見つけることができると考え、マウス Aggrus の deletion mutant を大腸菌で作製し、western-blot 法により 8F11 抗体の反応性を調べた (Fig. 8)。その結果、マウス Aggrus の 39-44 番目のアミノペプチドである 39-DGMVPP-44 が 8F11 抗体による認識部位と考えられた。さらに 8F11 抗体のエピトープを明らかにするため、マウス Aggrus 遺伝子の point mutant を CHO 細胞に発現させ、8F11 抗体による western-blot 法を行った (Fig. 9A)。その結果、40, 41, 42, 43 番目のアミノ酸をそれぞれアラニンに変換した変異株は 8F11 によって認識されなかった。さらに、39 番目から 47 番目までのアミノペプチド 39-DGMVPPGIE-47 を合成し、8F11 抗体の反応性を ELISA で調べたところ、変異のないペプチド WT には反応するが、41, 42, 43, 44 番目に変異を入れると 8F11 抗体に認識されなかった(Fig. 9B)。以上の結果より、8F11 抗体のエピトープは 39 番目から 44 番目までの 6 アミノペプチド 39-DGMVPP-44 であることが確認された。8F11 抗体がマウス Aggrus の血小板凝集の阻害抗体であり、そのエピトープの 39-DGMVPP-44 が活性部位と予想されることから、このエピトープに変異を入れると血小板凝集活性が阻害されることが予想された。しかし、41 番目のメチオニンをアラニンに変換した M41A によってマウスの血小板の凝集が引き起こされるという、予想と反する結果が得られた(Fig. 9C)。さらに、8F11 抗体によって認識される 39-DGMVPPGIE-47 によっても、血小板凝集が引き起こされなかった (data not shown)。よって、8F11 抗体によって認識されるアミノペプチドの中には、血小板に直接結合する

部位が含まれていないことがわかった。

Toyoshima らの研究により、Aggrus による血小板凝集には糖鎖が関与していることが示されていた (5)。そこで、8F11 抗体は、8F11 抗体結合ペプチドに結合することにより、その近傍の糖鎖の立体構造を変化させ、血小板凝集能を中和するのではないかと仮定した。マウス Aggrus の 34、37、51、52 番目のスレオニンアラニンに変換した mutant をそれぞれ CHO 細胞に発現させ、マウス血小板に対する反応性を調べた (Fig. 10A)。その結果、34 番目のスレオニンアラニンに変換した株 T34A のみが血小板凝集を引き起こさないことがわかった。Zimmer らの結果から、34 番目のスレオニンには O-結合型糖鎖が結合していることが予想されており、マウス Aggrus の血小板凝集能には 34 番目のスレオニンの O-結合型糖鎖が重要であることが示唆された (11)。そこで、マウス Aggrus の 34 番目のスレオニンの近傍のペプチド配列をヒト、ラット、イヌの Aggrus で検索したところ、EDXXVTPG という配列が保存されていることがわかり、この配列を PLAG (platelet aggregation stimulating) domain と名付けた (Fig. 10B)。ヒト Aggrus の 52 番目のスレオニンアラニンに変換した株 T52A では、同様に血小板凝集を引き起こさなかった (Fig. 10C)。以上より、マウス Aggrus の活性部位である PLAG domain が明らかとなった。

1-4 考察

癌細胞によって引き起こされる血小板凝集は、癌の転移の形成において重要な役割を果たしている (1)。いくつかの血小板凝集阻害剤が、癌の転移を阻害することが知られているが、この機構に関与する癌細胞膜上の分子に関しては同定されていなかった。

Tsuruo らにより、mouse colon adenocarcinoma 26 から、高い血小板凝集活性、肺転移能を持つ NL-17 細胞が樹立された (2)。8F11 抗体は、NL-17 細胞膜上に発現している Aggrus (gp44) を認識し、NL-17 細胞による血小板凝集、肺転移を阻害した (3)。Toyoshima らにより、このマウス Aggrus 分子が NL-17 細胞から精製され、Aggrus 分子は血漿成分非依存性に血小板凝集を引き起こすことが示された (5)。Aggrus はその分子量の半分を O-結合型糖鎖が占めており、精製したマウス Aggrus からペプチド配列を得ることが困難であった。そこで、今回我々は、Aggrus と発現部位や分子量、分子の性質の似通った糖タンパク質の検索を行い、T1 α /podoplanin というタンパク質が Aggrus と同一分子であることを発見した (20)。T1 α /podoplanin は様々なグループにより研究されているが、特に T1 α は I 型肺胞上皮細胞のマーカー、podoplanin はリンパ管のマーカーとして繁用されるようになった (16, 17)。しかし、これまで Aggrus/T1 α /podoplanin が癌細胞上に発現しているという報告はなく、マウスの大腸癌細胞やメラノーマ細胞にマウス Aggrus/T1 α /podoplanin が発現しており、癌細胞による血小板凝集や癌の転移に関係していることを、我々が初めて報告した (20)。

Fig. 5A に示す通り、マウス Aggrus の分子量は細胞によって異なる。Watanabe らの報告によっても、8F11 抗体によって NL-17 細胞では 44kDa のバンドが、B16 メラノーマ細胞においては約 41kDa のバンドが検出されている (22)。各細胞からクローニングした Aggrus 遺伝子は同一であることから、この分子量の差は、翻訳後修飾、特に Aggrus に大量に付加されている O-糖鎖の量の違いなのではないかと考えられる。この分子量の違いがあるにも関わらず、Aggrus による血小板凝集活性は Aggrus を発現しているすべての細胞で見られること、さらに CHO 細胞に発現させた recombinant Aggrus も血小板凝集活性を有することから、この糖鎖の付加の違いによる分子量の差は、Aggrus の血小板凝集活性には影響を与えないことがわかった。

Aggrus/T1 α /podoplanin については多くの研究が様々な系でなされているが、まだ Aggrus の生理的機能についてはわかっていない。Aggrus は I 型膜貫通型タンパク質であるが、C 末端に PKC や PKA によるリン酸化部位が存在する (7)。しかし、これまでの実験において、培養細胞における Aggrus を介した細胞内リン酸化は見られていない。さらに、Aggrus を様々な細胞に発現させても、細胞増殖には影響を与えない。Aggrus の配

列解析からは、機能の分かっている分子との相同性もなく、生理的機能は不明である。近年、T1 α のノックアウトマウスが Schacht らにより作製された (15)。T1 α のノックアウトマウスでは、正常なリンパ管の増生が見られず、リンパ水腫を引き起こしたことから、Aggrus がリンパ管新生に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、Ramirez らの研究により、T1 α のノックアウトマウスでは、正常な I 型肺胞上皮細胞の分化が阻害されていることも示された (14)。

Aggrus はその分子量の約半分が O-結合型糖鎖に占められている。Fig. 10 に示す通り、マウス Aggrus の 34 番目スレオニン、ヒト Aggrus の 52 番目のスレオニンにそれぞれ付加している O-結合型糖鎖が、Aggrus の血小板凝集活性に重要であることが示された。さらに、同様の point mutation の実験をラット Aggrus やイヌ Aggrus についても行ったところ、ラット Aggrus の 34 番目のスレオニン、イヌ Aggrus の 41 番目のスレオニンが、同様に Aggrus の血小板凝集活性に重要であることが示された。Zimmer らの研究により、イヌ Aggrus (gp40) の 41 番目のスレオニンには O-結合型糖鎖が付加されていることが示されている (11)。さらに Toyoshima らの研究により、Aggrus による血小板凝集には、O-結合型糖鎖、さらにはシアル酸が重要であることも示されている (5)。今後、Aggrus の PLAG domain (Fig. 10B) に付加している糖鎖の構造解析を行うことは、Aggrus の血小板側のレセプターを見つける際にも重要な情報になると考えられる。

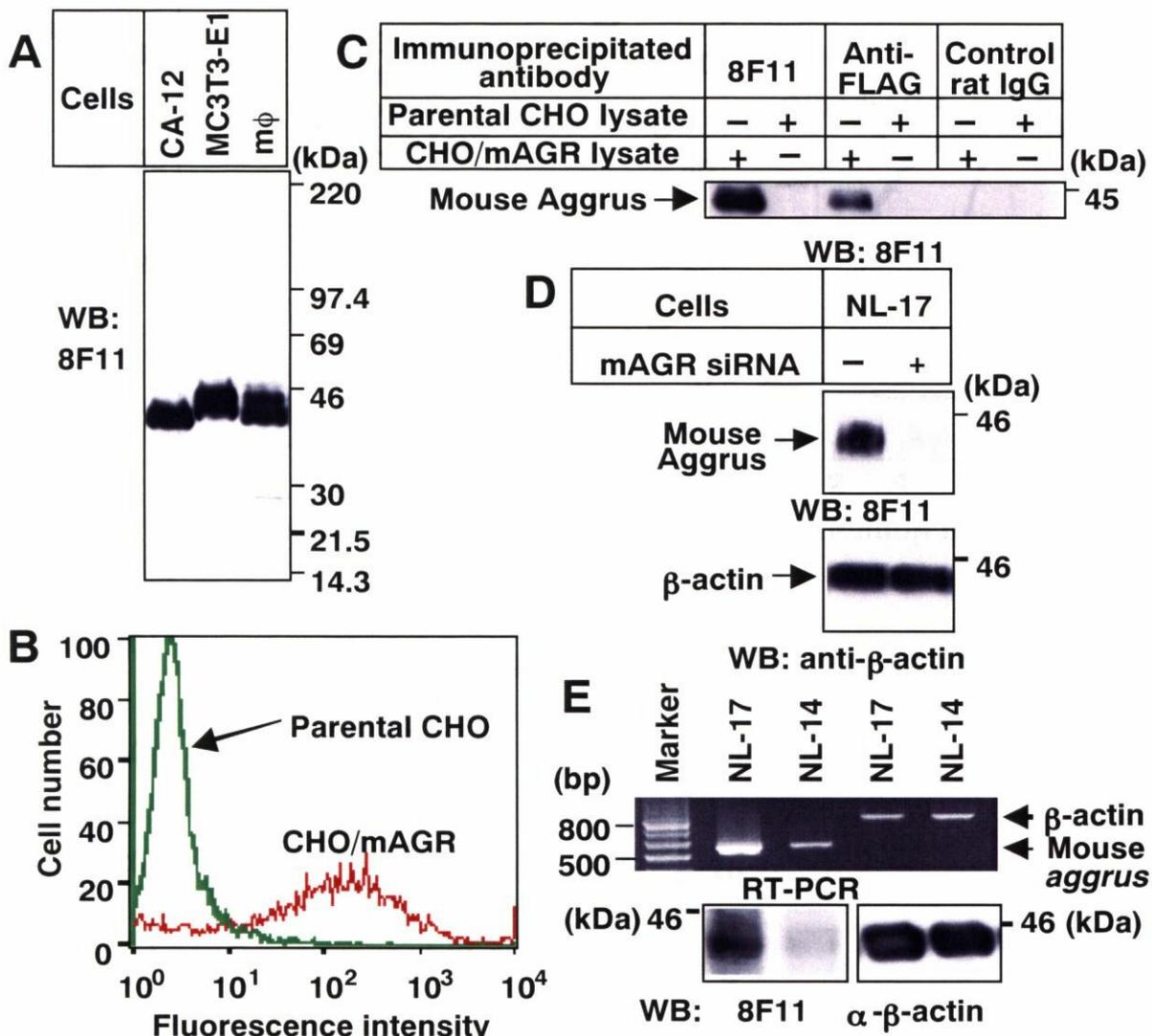


Fig. 5. Molecular identification of mouse Aggrus. **A**, The cell lysate of lymph node stromal CA-12, osteoblastic MC3T3-E1, and thioglycolate-elicited peritoneal macrophages (*mφ*) were electrophoresed and immunoblotted with 8F11 antibody. **B**, Flow cytometric analysis of 8F11 reactivity to parental CHO and a stable mouse Aggrus transfectant (CHO/mAGR). **C**, Parental CHO and CHO/mAGR cell lysates were incubated with protein G agarose that had been conjugated with 8F11 antibody, anti-FLAG antibody, or control rat IgG. After washing, immunoprecipitated proteins were electrophoresed and immunoblotted with 8F11 antibody. **D**, NL-17 cells were transfected with pcDNA3 vector plus non-silencing control siRNA (-) or mouse *aggrus* (*mAGR*) siRNA (+). Cells were harvested, electrophoresed, and immunoblotted with 8F11 antibody or anti-β-actin antibody. **E**, Semi-quantitative RT-PCR analysis and immunoblot analysis of mouse Aggrus or β-actin mRNA and protein expression in NL-17 and NL-14 cells.

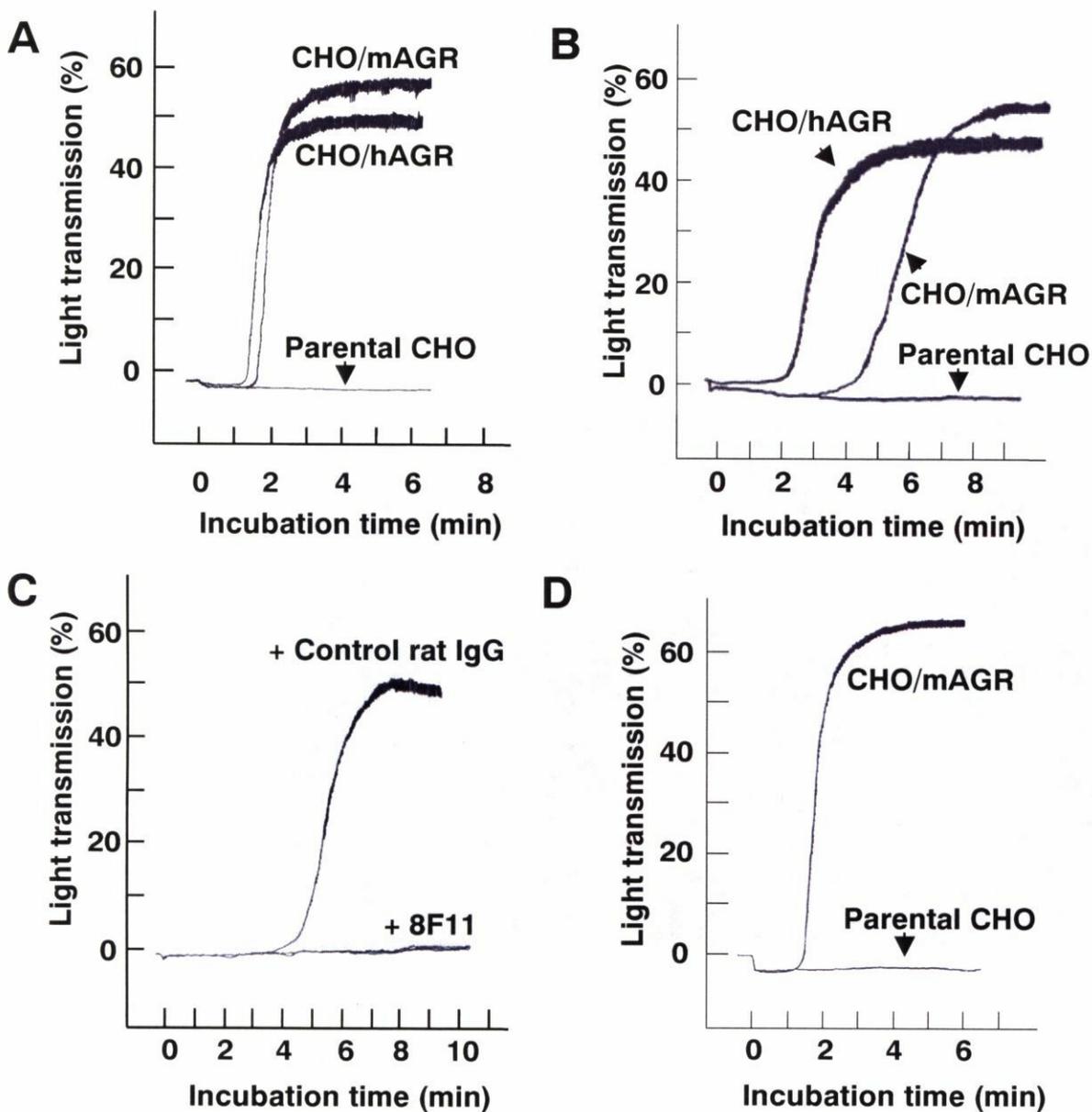


Fig. 6. Mouse and human Aggrus proteins possessed the ability to induce aggregation of human and mouse platelets. **A** and **B**, The platelet aggregation-inducing capability of parental CHO, a stable mouse Aggrus transfectant (CHO/mAGR), or a transient human Aggrus transfectant (CHO/hAGR) was estimated by incubating the cells with mouse PRP (**A**) or human PRP (**B**). **C**, CHO/mAGR cells were preincubated with 1 mg/ml of control rat IgG or 8F11 on ice. After incubation for 20 min, the platelet aggregation-inducing capability was estimated by incubating cell suspension with mouse PRP. **D**, The platelet aggregation-inducing capability of parental CHO or CHO/mAGR was estimated by incubating the cells with washed mouse platelets.

parental CHO



CHO/hAGR



Fig. 7. Assay of Experimental Metastasis. The mock- or human aggrus-transfected CHO cells (CHO/hAGR; 5×10^5 cells/mouse; lower) were inoculated intravenously into lateral tail vein of BALB/c-nu/nu. Pulmonary metastasis was examined on day 19 after the tumor inoculation.

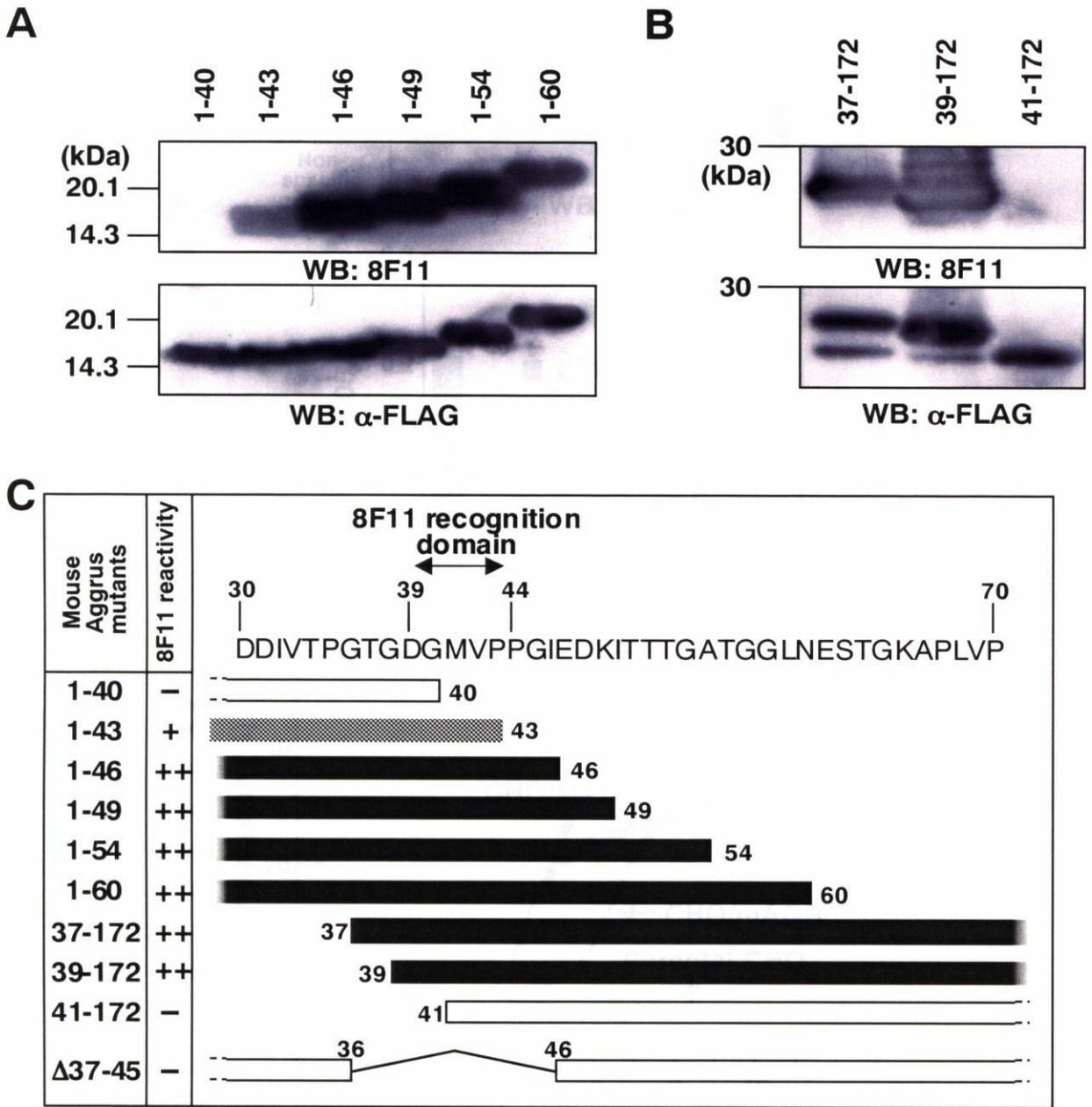


Fig. 8. Identification of the 8F11 antibody-recognition domain in mouse Aggrus. **A** and **B**, The indicated FLAG-tagged mouse *aggrus* deleted cDNAs were ligated into pET-21a vector, and the recombinant mouse Aggrus proteins were expressed in *E. Coli*, electrophoresed, and immunoblotted with 8F11 antibody or anti-FLAG antibody. **C**, Amino acid sequences of mouse Aggrus deletion mutants used in these experiments and their 8F11 reactivity are shown schematically (strong binding, *solid bars*; weak binding, *gray bar*; no binding, *open bars*).

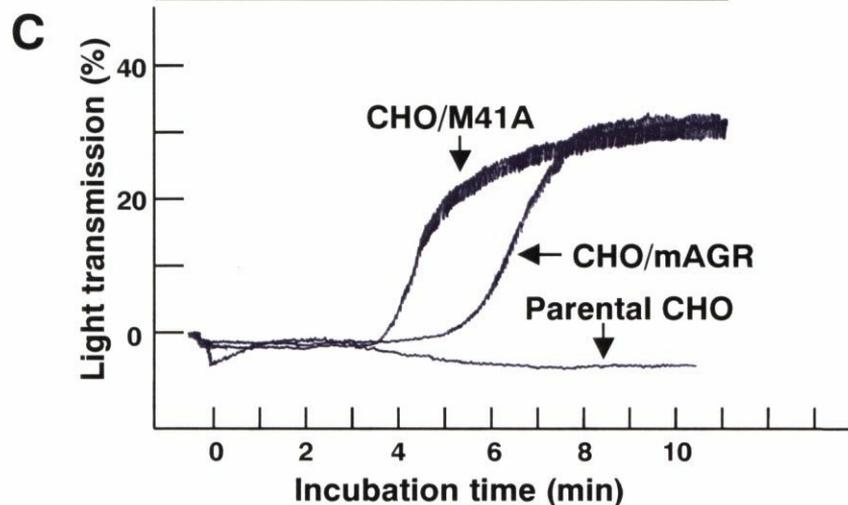
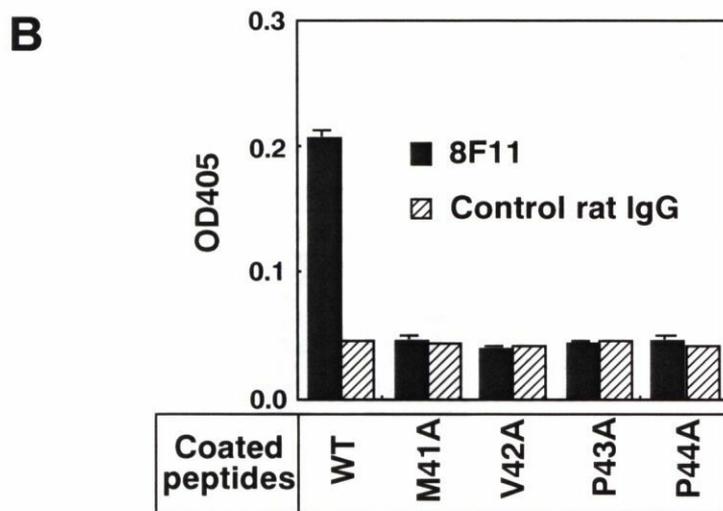
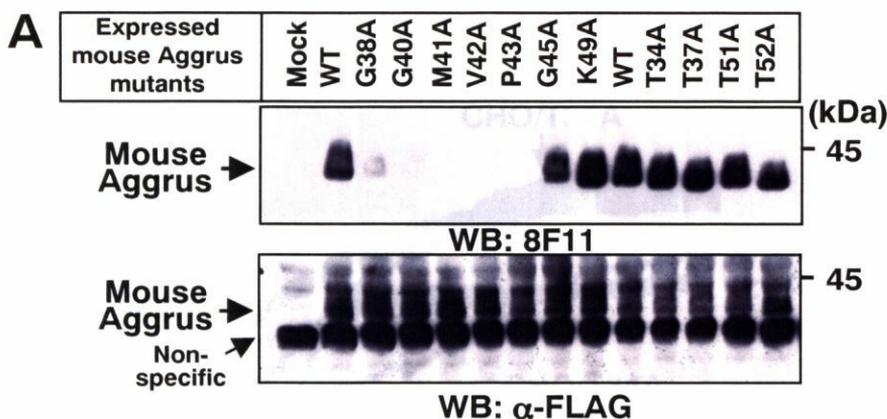
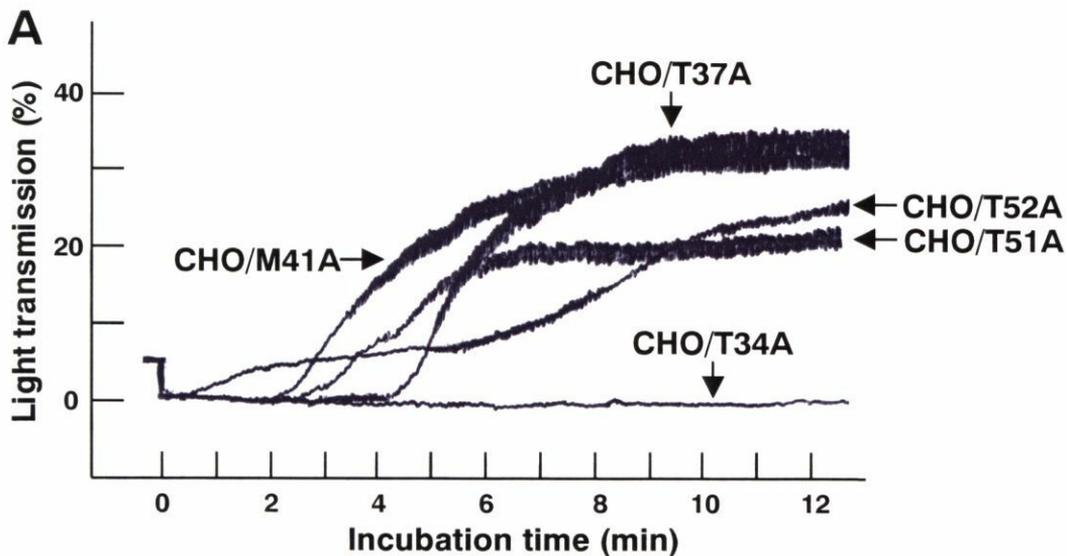


Fig. 9. Confirmation of amino acid residues recognized by the platelet aggregation-neutralizing 8F11 antibody. **A**, CHO cells were transiently transfected with a pcDNA3 vector containing none (Mock), WT-, or the indicated mutant mouse *aggrus* cDNAs. The cell lysates were immunoblotted with 8F11 or anti-FLAG antibody. **B**, The synthetic DGMVPPGIEC peptide (WT) corresponding to amino acids 39-47 of mouse Aggrus sequence plus C-terminal cysteine and its mutant peptides were immobilized on 96-well plate. The reactivity of 8F11 antibody and control rat IgG was estimated by ELISA. Each point represents a mean \pm SD of triplicate determinations. **C**, The platelet aggregation-inducing activity of parental CHO, a stable mouse Aggrus transfectant (CHO/mAGR), or a transient M41A-mouse Aggrus transfectant (CHO/M41A) was estimated by incubating the cells with mouse PRP.



B PLAG (Platelet Aggregation-Stimulating) domain

	E	D	X	V	T	P	G
Human: 46 - A	ED	DV	V	TP	GT	SE	- 57
Mouse: 28 - N	ED	DI	V	TP	GT	GD	- 39
Rat: 28 - L	ED	DL	V	TP	PG	PGD	- 39
Dog-1: 35 - V	ED	SV	V	TP	GT	ED	- 46
Dog-2: 44 - T	ED	SV	V	TP	GA	AED	- 55

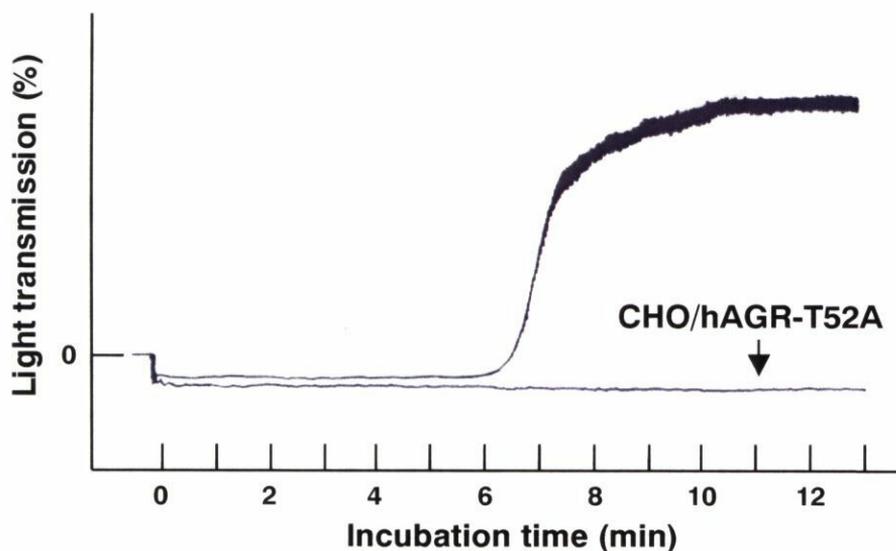


Fig. 10. Identification of platelet aggregation-stimulating (PLAG) domain in Aggrus protein. **A**, CHO cells were transiently transfected with mouse *aggrus* cDNA carrying the indicated point mutations. Their platelet aggregation-inducing capabilities were estimated by incubating the cells with mouse PRP. **B**, Alignment of the amino acid sequence of Aggrus homologues around the PLAG domain. Identical amino acids are denoted by white letters on black background. An asterisk indicates the possible *O*-glycosylation site. **C**, CHO cells were transiently transfected with T52A- or T55A-human *aggrus* cDNA (CHO/hAGR-T52A or CHO/hAGR-T55A, respectively). Their platelet-aggregation inducing capabilities were estimated by incubating the cells with mouse PRP.