

博士論文

血小板凝集因子 Aggrus の新規血小板結合部位 PLAG4 の同定と
中和抗体による抑制効果

関口 貴哉

目次

要旨.....	1
序論.....	4
本論.....	11
第一章 血小板凝集因子 Aggrus の新規 CLEC-2 結合部位 PLAG4 ドメインの同定	11
1-1. 血小板凝集因子 Aggrus における新規 CLEC-2 結合部位の探索.....	11
1-2. Aggrus と CLEC-2 の結合解析.....	21
第二章 PLAG4 ドメインに対する中和抗体の作製とその性質	28
2-1. 抗体の作製.....	28
2-2. 抗体の性質.....	37
第三章 抗 PLAG4 抗体 PG4D1, PG4D2 の Aggrus-CLEC-2 結合阻害活性の検証	49
3-1. <i>In vitro</i> における Aggrus-CLEC-2 結合阻害活性の評価.....	49
3-2. <i>In vivo</i> における Aggrus-CLEC-2 結合阻害活性の評価.....	55
総括.....	64
材料と方法.....	69
参考文献.....	80
謝辞.....	86

要旨

【背景】

近年の日本において、がん罹患者の 9 割はがんの転移によって亡くなると言われている。がんが転移巣を形成するためには、(1) 原発巣からの浸潤、(2) 血管内への侵入、(3) 血流による移動、(4) 血管壁への接着・微小血管での塞栓の形成、(5) 血管外への遊出、といった過程を経る必要がある。この際のがん細胞は (3) 血流による移動において、0.01% しか生存できないと言われているが、この際のがん細胞が血小板と相互作用し、凝集塊を形成することで、微小血管での塞栓の形成促進、血流のせん断応力・免疫細胞からの攻撃の回避により、がんの生存や転移に有利に働くことが知られている。さらに原発巣に浸潤した血小板が、がん細胞特異的に活性化されることで液性因子を放出し、がん細胞の増殖および転移に寄与することが示唆されている。これらのことより、がん細胞と血小板の相互作用を阻害することは有望ながんの治療戦略だと考えられている。

当研究室で血小板凝集誘導因子として同定した Aggrus/podoplanin は高転移性がん細胞の細胞膜に発現する糖タンパク質であり、肺扁平上皮がんや口腔扁平上皮がん、悪性脳腫瘍、悪性中皮腫、膀胱がんなどで高発現が確認されている。Aggrus は血小板表面に発現するレセプター CLEC-2 と結合して血小板を活性化し、血小板凝集を誘導する。Aggrus と CLEC-2 の結合部位は PLAG (PLatelet AGgregation-stimulating) ドメインと呼ばれ、哺乳類では 3 つの PLAG ドメインが連続した構造を取っている (PLAG1/2/3 ドメイン)。ヒト Aggrus においては PLAG3 ドメインが CLEC-2 との相互作用に関与していることが示されている。当研究室では、PLAG3 ドメインを標的とする抗 Aggrus 中和抗体 MS-1 を創製し、その実験的肺転移の抑制効果を報告してきた。しかしながら、この抗体による Aggrus-CLEC-2 相互作用の抑制効果は完全ではないこと、PLAG3 ドメインに機能喪失変異を導入しても CLEC-2 との結合は部分的にしか減少しないことから、PLAG3 ドメイン以外にも CLEC-2 との結合部位が存在することが示唆されていた。以上より私は、Aggrus の新たな CLEC-2 結合部位の同定と、中和抗体の作製により、Aggrus 陽性がんを標的とした抗転移薬・抗腫瘍薬の開発につながることを目的として研究を行った。

【結果】

PLAG4 ドメインの同定

私は PLAG ドメインが哺乳類において進化的に保存されていることに着目し、Aggrus タンパク質全長の進化的保存性を調べた。哺乳類 42 種類の Aggrus タンパク質配列を用いて進化的に保存された領域の検索を行ったところ、Aggrus タンパク質配列の中流に、種間で保存された領域を発見した。この領域は興味深いことに PLAG ドメインのコンセンサス配列に類似した構造を有していたことから、この領域を PLAG4 ドメインと命名し、PLAG4 ドメインが CLEC-2 との結合に関与しているのかを明らかにすべく、機能解析を行った。

PLAG3 ドメインにおいて CLEC-2 との結合に重要なアスパラギン酸(D48)とそれに相同な PLAG4 ドメインのアスパラギン酸(D82)をアラニンに変異させた Aggrus を発現する CHO 細胞を作製し(CHO/Aggrus-D48A, -D82A)、FACS を用いて CLEC-2 との結合能を評価した。その結果、PLAG3 ドメインを変異させた Aggrus-D48A よりも、PLAG4 ドメインを変異させた Aggrus-D82A の方が CLEC-2 との結合能が大幅に低下することが分かった。さらに PLAG3/PLAG4 両ドメインを変異させた Aggrus-D48A/D82A は CLEC-2 と結合できなくなることが明らかになった。これらの Aggrus 変異体を発現する CHO 細胞株を用いて血小板凝集実験を行ったところ、PLAG4 ドメイン変異体の方が PLAG3 ドメイン変異体よりも血小板凝集の誘導活性が弱いことが分かった。さらに、PLAG3/PLAG4 両ドメインの変異体は血小板凝集を誘導できないことが明らかになった。

これらの結果より、PLAG4 ドメインは、PLAG3 ドメイン同様 CLEC-2 と相互作用し、血小板凝集を誘導するドメインであることが示された。また、PLAG4 ドメインは PLAG3 ドメインに比べて CLEC-2 との結合能が強いこと、ヒト Aggrus と CLEC-2 の相互作用は PLAG3 ドメインと PLAG4 ドメインの 2 か所を介していることが示唆された。

PLAG4 ドメインに対する中和抗体の効果

PLAG4 ドメインを直接阻害することによって CLEC-2 との結合を抑制できるかを確かめるべく PLAG4 ドメインを標的とするマウスモノクローナル抗体の作製を行った。PLAG4 ドメインを含む配列を繰り返しつなげたリコンビナントタンパク質を作製し、マウスに免疫した。複数回の免疫後、脾細胞を回収しミエローマと融合することでハイブリドーマを作製した。有用な抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、PLAG4 ドメインに対する抗体である PG4D1 と PG4D2 という 2 種類の抗体を取得した。これらの抗体は PLAG4 ドメインを含む領域を認識し、非常に強力な結合活性 ($KD \leq 0.3 \text{ nM}$)を有していた。

Aggrus と CLEC-2 のリコンビナントタンパク質を用いて両者の相互作用の中和活性を評価した。すると、PG4D1/PG4D2 抗体は共に Aggrus-CLEC-2 相互作用を濃度依存的に阻害できることが分かった。血小板凝集の抑制効果を評価したところ、PG4D1/PG4D2 抗体の添加によって、Aggrus 依存的な血小板凝集の開始は遅延した。この遅延効果は PLAG3 ドメインに対する中和抗体である MS-1 の阻害効果よりも強力だった。さらに PG4D2 と MS-1 を併用することによって、血小板凝集をほぼ完全に抑制できることを確認した。

次にマウス血行性転移モデルを用いて抗体の活性評価を行った。CHO/Aggrus 細胞をマウス尾静脈に注射し、肺表面にできた転移結節数を測定したところ、PG4D1/PG4D2 抗体の投与により、Aggrus 依存的な肺転移は抑制された。さらに PG4D2 抗体の抗腫瘍効果を検証するために、マウス Xenograft モデルを用いて薬効を評価した。Aggrus を発現する肺扁平上皮がん細胞である PC-10 細胞を NOD/SCID マウスに皮下移植し、抗体投与による腫瘍増大への効果を解析した。結果、PG4D2 抗体はコントロール抗体と比較して、有意に腫瘍の増殖を抑制した。

以上の結果より、作製した抗 PLAG4 抗体 PG4D1/PG4D2 は Aggrus-CLEC-2 相互作用を阻害することで、血小板凝集を抑制し、がん転移と腫瘍の増殖を抑制できることが示された。

【まとめ】

本研究では、血小板凝集誘導因子である Aggrus/podoplanin において、理解が進んでいなかった CLEC-2 との相互作用の解明を目指した。結果、新たな結合部位である PLAG4 ドメインを発見し、PLAG4 ドメインが既知の結合部位である PLAG3 ドメインよりも強力に CLEC-2 と結合できることを明らかにした。また Aggrus が PLAG3 ドメインと PLAG4 ドメインの両方を介して血小板と結合していることを示した。

次に私は PLAG4 ドメインに対する中和抗体である PG4D1 と PG4D2 の創製に成功し、これらの抗体が Aggrus を発現するがん細胞の血小板凝集誘導活性、肺転移活性を強力に抑制することを見出した。さらに PG4D2 抗体はマウス Xenograft モデルを用いた薬効評価において、抗腫瘍効果を発揮し、腫瘍の増殖を抑制できることを示した。

以上の結果より、PLAG4 ドメインはがん細胞と血小板の相互作用の阻害を目的とした治療における有望な標的であると言える。そして PLAG4 ドメインに結合する PG4D1/PG4D2 抗体はがんの転移と増殖を抑制できる有望な分子標的薬になりうるだろう。今後、臨床での応用を目指す上で、抗体の副作用解析や、様々な種類のがんにおいて Aggrus 発現量と腫瘍での血小板の浸潤度/活性化を評価することが治療効果の予測に重要であると考えられる。

序論

日本における死因のトップは「がん」である。1981年にそれまで1位だった脳卒中を抜き、長らくトップに位置している。近年においては2人に1人ががんにかかり、3人に1人ががんで亡くなると言われている。がんについての理解やがんの治療法の開発は進み、生存率が伸びたがんもあるが、依然としてがんで亡くなる患者さんは多く、克服法の開発は求められ続けている。

従来のがん化学療法では、がん細胞が正常な細胞よりも活発に増殖する性質を標的として細胞増殖阻害作用を発揮する医薬品が主であったが、同時に正常細胞も傷つけてしまうことから、がんの特異的に傷害作用を発揮する医薬品の開発が進んだ。そこでがん細胞特異的な分子やがんの増殖を亢進する分子を標的にした、分子標的薬の開発が主流となった。この考え方は非常に有効で、EGFR阻害薬のGefitinibでは、これまでの化学療法と比較してPFSの中央値が5.4カ月から10.8カ月と伸びた[1]。

さらにがんの理解は進み、がんは患者さんの体内で自身の住みやすい「微小環境」を自ら整備していることが分かってきた。がん細胞が腫瘍の低酸素、栄養飢餓状態を克服するために血管を新生したり[2]、がん細胞により"教育"を受けた繊維芽細胞やマクロファージが液性因子を放出し、がんの生存に有利な環境を整備することが知られている[3,4]。これらの知見を治療に応用すべく、微小環境を標的とする医薬品について注目が集まっている。昨今がんの第4の治療法として熱心に研究が行われているがん免疫療法は、微小環境を標的とした治療法の最たる例である[5]。がんが自らを排除しようとする免疫系にブレーキをかけることで自身の増殖を助長する。このブレーキを医薬品によって外し、人間が本来持っている免疫システムを最大限発揮することでがんを治療する[6]。

だが依然としてがんの根治は難しい。がんを知り、がんを制する医薬品が登場しても、がんは対抗策をひねり出し"耐性化"する[7,8]。そして他の部位へ転移して患者さんの体を蝕んでいく[9]。実際、がん罹患者の約9割はがんの転移によって亡くなると言われている[10]。このため、原発巣を治療することに加え、転移巣を治療すること、またがん転移をより深く理解し、がん転移そのものを抑制することは重要である。

当研究室では血小板が作り出すがんの微小環境に着目して研究を行っている。血小板は血液に含まれる血球成分の1つであり、巨核球の細胞質より産生される。主な役割は止血である。血管に傷が入った際に、傷口に集積し、血小板凝集塊を形成することによって止血作用を示す。血小板の凝集が起こる時に血小板は活性化し、形状を変化させる。偽足を

伸ばし、これが絡み合うことによって強固な凝集塊を形成する[11]。その際に α 顆粒や濃染顆粒、リソソームなどから多くのタンパク質が放出される。これらの血小板由来因子は止血だけではなく、炎症や細胞増殖、血管新生、がんの悪性化にも関わるということが報告されている[12]

がん患者さんにおいては、抗がん剤の投与によって血小板が減少してしまうことが知られている[13]。一方でがん患者さんの 22%には血小板の増加が確認されており、血小板増加症は予後不良因子であるとも言われている。低血小板症を模した実験モデルにおいて、低血小板が抗転移効果を示すこと[14]や、遠隔転移を有するがん患者さんは血小板の反応性が高く、血小板凝集を起こしやすくなっており、血栓の発生率が高いことが報告されている[15,16]など、血小板ががん転移の促進に関与することが広く示唆されている。がん転移には血行性転移、リンパ行性転移、播種性転移があると言われている。特に血小板が関与するがんの血行性転移では、原発巣が転移巣を形成するために、(1)原発巣からの浸潤、(2)血管内への侵入、(3)血流による移動、(4)血管壁への接着・微小血管での塞栓の形成、(5)血管外への遊出、といった過程を経る必要がある。この際のがん細胞は(3)血流による移動において、0.01%しか生存できないと言われている[12,17]が、がん細胞が血小板と相互作用し、凝集塊を形成することで、がん細胞の血管内皮細胞への接着促進、微小血管に詰まりやすくなることによる塞栓の形成促進[18]、血流によるせん断応力からの回避[19]、血小板を纏うことにより腫瘍が血小板の MHC Class I を擬似的に提示できることで免疫寛容を起こす[20]など、血小板凝集はがんの生存や転移に有利に働くことが知られている(Fig. 0-1)。さらに原発巣に浸潤した血小板が、がん細胞特異的に活性化されることで増殖因子やサイトカインを放出し、がん細胞の増殖および転移に寄与することが示唆されている[21]。以上より、がん細胞と血小板の相互作用を阻害することはがんの悪性化を防ぐ、有望ながんの治療戦略だと考えられている。

当研究室において、マウスの結腸癌細胞株である Colon26 細胞を用いて、実験的肺転移を繰り返し行うことで高転移性の細胞株の作製を行い、高転移性細胞株 NL-17 と低転移性細胞株 NL-14 の 2 株を取得した[22]。高転移性を示す NL-17 細胞は *In vitro* において、高い血小板凝集活性を示すこと、NL-17 細胞の細胞膜画分も血小板凝集を誘導できることから、NL-17 細胞の細胞膜に高発現している血小板凝集誘導因子のスクリーニングを行い、責任分子として Aggrus を同定した[23]。この Aggrus は別名 Podoplanin, gp36, T1alpha, PA2.26 antigen などとして知られている一回膜貫通型のタンパク質であり、O-結合型糖鎖が複数結合した

ムチン様の糖タンパク質である[24–28]。Aggrus は各種の扁平上皮がん（肺がん、食道がん、口腔がん、咽頭がん、喉頭がん、皮膚がん、子宮頸がん）や中皮腫、グリオブラストーマ、膀胱がん、精巣がん、骨肉種などで高発現していることが知られており[28–33]、Aggrus の発現量とその悪性度が相関しているという報告もある[30,34,35]。Aggrus を高発現させた CHO 細胞は血小板凝集を誘導し、この細胞をマウスの尾静脈から移植することによって、肺転移巣の形成を促進することから、がん転移促進因子としても知られている[18]。

Aggrus の血小板上のレセプターは、C-type lectin like receptor 2 (CLEC-2) [36]であることが同定され、Aggrus と CLEC-2 が結合して血小板を活性化し、血小板凝集を誘導することが示されている(Fig. 0-2) [37]。Aggrus ノックアウトマウスと CLEC-2 ノックアウトマウスの研究において、発生過程でリンパ管内皮細胞に発現する Aggrus と血小板の CLEC-2 が相互作用することによって血小板凝集を起こし、これが血管とリンパ管の隔壁となり、血管-リンパ管分離を誘導することが示されている[38,39]。発生過程においては重要な役割を持つ CLEC-2 であるが、CLEC-2 を欠損した血小板は、Collagen や ADP、PAR-4 といったアゴニストによる刺激に対しては正常に反応し、血小板凝集すると報告されている[40]ことから、Aggrus-CLEC-2 相互作用を阻害しても、生理的な止血には影響を与えないと考えられており、Aggrus は有望な治療標的と考えられている。

Aggrus 上の CLEC-2 との結合部位は、PLAG (PLatelet AGgregation-stimulating)ドメインと呼ばれている[41]。哺乳類において、3つの PLAG ドメインが連続した構造を取っている[42]。ヒト Aggrus においては PLAG3 ドメインが CLEC-2 との相互作用に関与していることが示されている[41]。特に Thr⁵² に結合する糖鎖のシアル酸が CLEC-2 との結合・血小板凝集の誘導に重要であることが知られている[43,44]。更に、近年 Aggrus の PLAG3 ドメインペプチドと CLEC-2 の結晶構造が解かれ、PLAG ドメインのグルタミン酸とアスパラギン酸、既報のスレオニンに結合する糖鎖のシアル酸が CLEC-2 との結合を形成していることが示された[45]。

これまでに、当研究室で PLAG3 ドメインを含む領域を認識し、Aggrus と CLEC-2 の結合を阻害する P2-0 抗体[46]や MS-1 抗体[47]が創製され、抗体による Aggrus 依存的な血小板凝集・実験的肺転移の抑制効果、また抗腫瘍効果を報告してきた[47]。他グループでも PLAG3 ドメインに対する中和抗体が作成され、その Aggrus-CLEC-2 結合の阻害効果が示されてきた[48,49]。しかしながら、これらの抗体による Aggrus-CLEC-2 相互作用の抑制効果は完全ではないこと、PLAG3 ドメインに機能喪失変異を導入しても CLEC-2 との結合は部分的に

しか減少しないこと(Fig. 0-3) [50]から、PLAG3 ドメイン以外にも CLEC-2 との結合部位が存在することが示唆されていた。

以上より、私は Aggrus の新たな CLEC-2 結合部位の同定と、この部位に対する中和抗体の作製および阻害効果の検証により、Aggrus 陽性がんを標的とした抗腫瘍薬・抗転移薬の創製を目的として研究を行った。

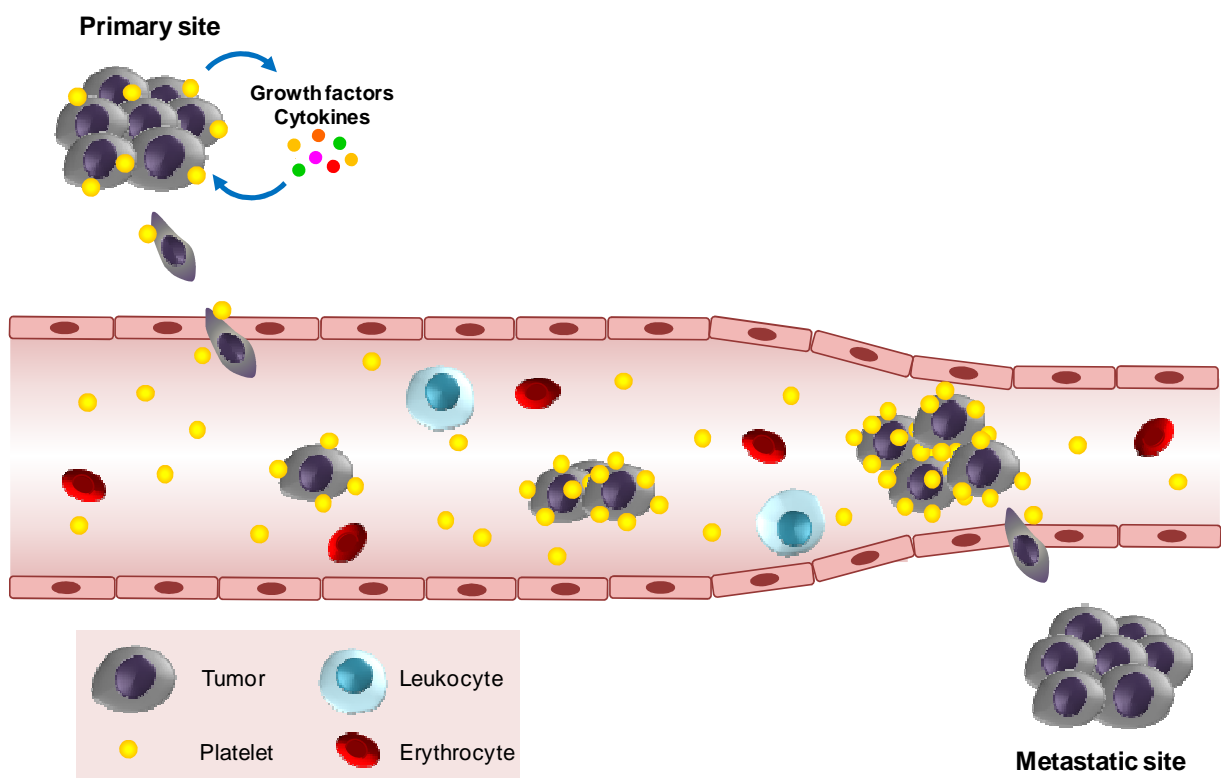


Fig. 0-1 血小板凝集ががん細胞に与える影響

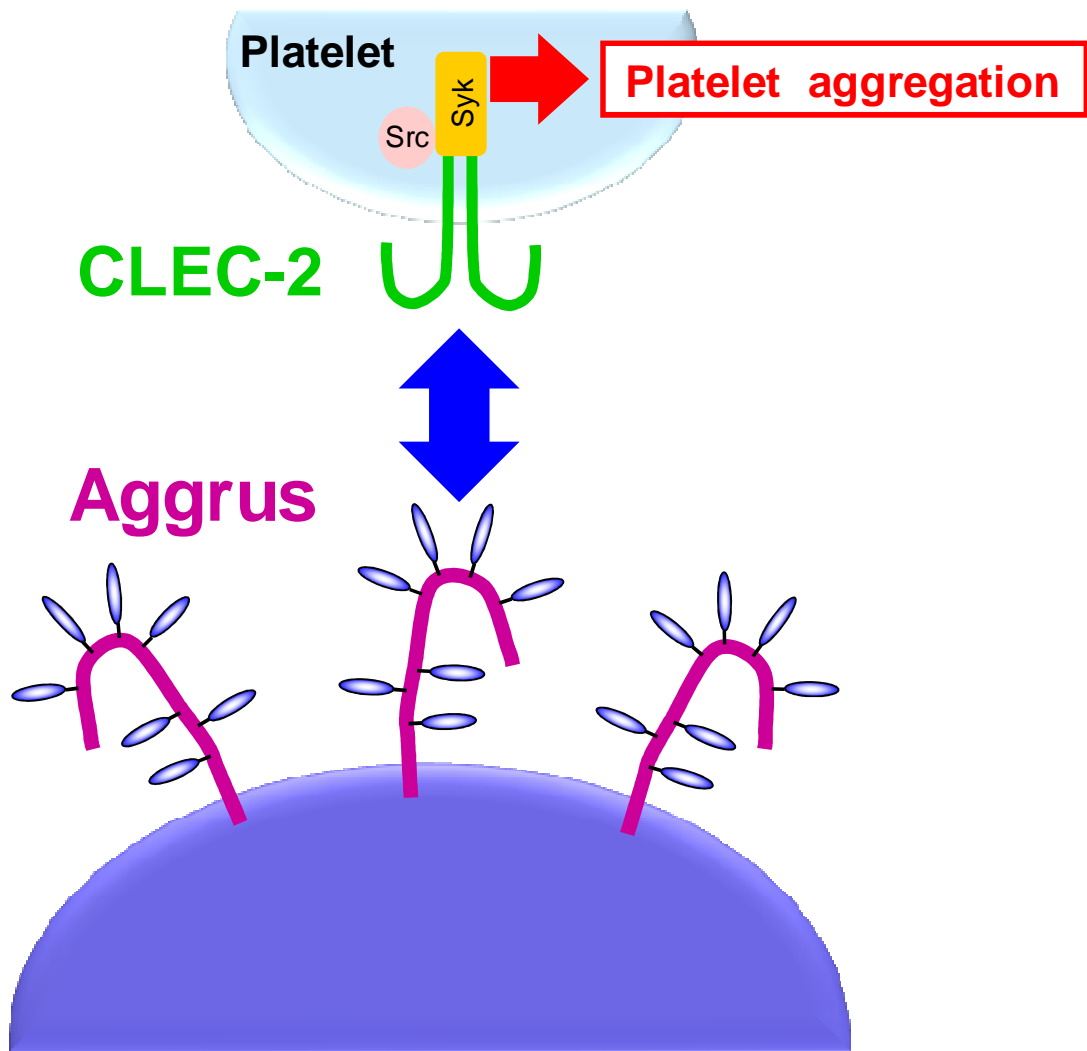


Fig. 0-2 血小板凝集因子AggrusはCLEC-2と結合し、血小板凝集を誘導する

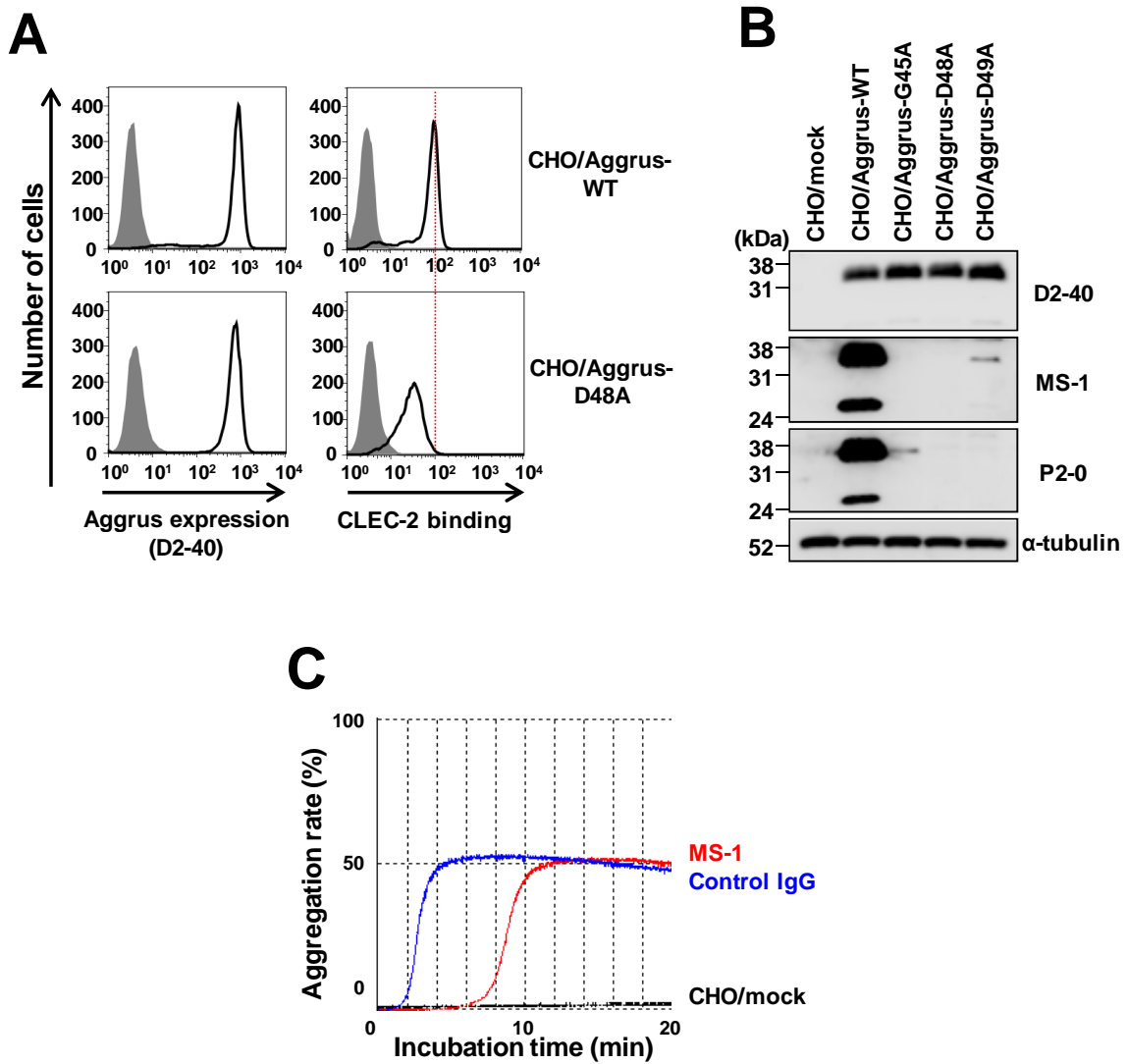


Fig. 0-3 AggrusのPLAG3ドメインとCLEC-2の相互作用

A. CHO/Aggrus-D48A 変異株はCLEC-2との結合が減弱する。B. 抗PLAG3抗体のP2-0抗体とMS-1抗体はG45、D48、D49を認識する。C. MS-1抗体は血小板凝集の開始を遅延させる。

本論

第一章 血小板凝集因子 Aggrus の新規 CLEC-2 結合部位 PLAG4 ドメインの同定

目的

これまでに Aggrus の CLEC-2 との結合部位である PLAG3 ドメインの重要性が多く報告され[45,47,49]、PLAG3 ドメインを標的とした中和抗体が作られてきた。新規 CLEC-2 結合部位は PLAG3 ドメインと同様に重要だと考えることができ、分子標的薬創製の有望なターゲットになると推測される。私は Aggrus と CLEC-2 の結合についてより深く理解すべく、また新たな分子標的薬の標的同定の為、Aggrus の新規 CLEC-2 結合部位の探索を行った。

1-1. 血小板凝集因子 Aggrus における新規 CLEC-2 結合部位の探索

1-1-1. Window 解析による CLEC-2 結合部位の探索

新規 Aggrus-CLEC-2 結合部位の探索に際し、私は PLAG ドメインの配列保存性に着目した。PLAG ドメインは哺乳類の Aggrus のタンパク質配列において 3 つ連続して存在していることが知られている[42]。私は未知の CLEC-2 結合部位も生物種間で保存されているのではないかと考え、哺乳類の Aggrus タンパク質配列全長における、配列保存性の評価を行った。NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の Protein RefSeq (Reference Sequence) データベースに登録されている哺乳類の Aggrus/podoplanin タンパク質配列をダウンロードした(主にプレフィックス「NP_」「XP_」配列からなる)。この配列群から Aggrus の配列ではないものを除外、1 つの生物種につき 1 つの代表的なアイソフォームを選択することで、42 種類の配列を選び出した(Table. 1)。次に選択したタンパク質配列をヒト Aggrus タンパク質配列に合致するように、また gap ができるべく少なくなるように配列アラインメントを行った。

作成したマルチプルアラインメントを用いて Window analysis を行い、保存性の評価、および親水性の評価を行った。AL2CO プログラム[51]を用い、Window size = 3 AA にて保存領域の検索を行ったところ、Aggrus タンパク質配列のシグナル配列(1-21a.a.)と細胞膜領域、細胞内領域(125-162a.a.)を除く、細胞外領域において、4 か所、生物種間で高度に保存された領域を発見した。1 か所目は 28-PEDD-31、2 か所目は 45-GAED-48、3 か所目は 81-ED-82、4 か所目は 105-ATSH-108 であった(Fig. 1-1)。このうち 1 か所目は PLAG1 ドメインであり、2 か所目は PLAG3 ドメインであった。他の 2 か所の保存領域について調べると、3 か所目の保存領域はアミノ酸配列 1 文字ごとに保存性の検証を行うと、81-EDLPT-85 が保存されて

いることが分かった。特に E81、D82、T85 はどれも高度に保存されている(100%、88%、98%)ことが分かった。興味深いことにこの配列は PLAG ドメインの配列(EDxxxT)に良く似ていた。4 か所目の保存領域は、アミノ酸配列 1 文字ごとに保存性の検証を行うと、106-TSHS-109 が種間で保存されていることが分かった。特に T106、S107、S109 が高度に保存されていた(100%、90%、93%)。TSHS 配列を NCBI の Protein BLAST で Taxon を *Homo sapiens* に限定して検索を行うと、細胞膜に発現するタンパク質やムチンなどが相同な配列を有していることが分かった。特に Mucin-12 は TSHS 配列を 26 か所、Mucin-3A は TSHS 配列を 18 か所タンパク質全長内に有していた。

次にこのマルチプルアラインメントを用いて、Hydropathy Plot [52]を行い、配列中の親水性を評価した。その結果、1 か所目の保存領域(PLAG1 ドメイン)、2 か所目の保存領域(PLAG3 ドメイン)、3 か所目の保存領域は酸性を示し、4 か所目の保存領域は中性を示した(Fig. 1-1)。

これらの結果から、PLAG ドメインと類似性しており、極性も一致していた 3 番目の保存領域である 81-EDLPT-85 が CLEC-2 との結合に関連する領域であると仮定し、この領域を”PLAG4 ドメイン”と命名して、その機能について検証を行うことにした(Fig. 1-2)。

1-1-2.機能喪失変異の導入による PLAG4 ドメインの解析

PLAG4 ドメインは PLAG3 ドメインで CLEC-2 との結合に関与すると言われている 3 種類のアミノ酸(E81、D82、T85)を全て有している。もし PLAG3 ドメインと同様にこれら 3 つのアミノ酸を使って CLEC-2 と結合しているとしたら、これらのアミノ酸を変異/欠失させることによって CLEC-2 との結合能や血小板凝集能を低下させることが出来ると考えられる。以上から、PLAG4 ドメインに変異を導入し、表現系の変化を調べた。

初めに PLAG ドメインが欠損した Aggrus を発現する CHO/Aggrus- Δ PLAG ドメイン変異体(Δ PLAG1; Δ 29-34, Δ PLAG3; Δ 47-52, Δ PLAG4; Δ 81-85, Δ PLAG3/ Δ PLAG4; Δ 47-52/ Δ 81-85)を作製し、Aggrus の発現が一定になるように各変異体からクローンを取得した。これらのクローンをを用いてリコンビナント CLEC-2 との結合能を FACS で評価したところ、CHO/Aggrus- Δ 29-34 株では CLEC-2 との結合に変化はなく、CHO/Aggrus- Δ 47-52 株は、若干 CLEC-2 との結合能が低下した。CHO/Aggrus- Δ 81-85 株は CHO/Aggrus- Δ 47-52 株よりも大幅に CLEC-2 との結合能が低下した。さらに、CHO/Aggrus- Δ 47-52/ Δ 81-85 株においては CLEC-2 と結合できなくなった(Fig. 1-3)。

アミノ酸の欠損による立体構造の変化を考慮するため、PLAG ドメインの CLEC-2 との結合に関わるアミノ酸を点変異させた Aggrus を発現する CHO 細胞を準備した。PLAG3 ドメ

インの CLEC-2 との結合に重要と言われるアミノ酸 D48 [45]と相同な PLAG4 ドメインの D82 にアミノ酸点変異を加えた D82A で評価を行った。欠損変異体と同様に Aggrus の発現をそろえたクローンを用いて CLEC-2 との結合実験を行った。結果、欠損変異体と同様に点変異体においても PLAG4 ドメインの変異によって PLAG3 ドメインの変異より大幅に CLEC-2 との結合能が低下すること、PLAG3/PLAG4 ドメインの同時変異によって CLEC-2 と結合できなくなることが分かった(Fig. 1-4)。

次にこれらの点変異細胞株を用いて CLEC-2 との結合能が血小板凝集誘導活性にどれほど影響を与えるかについて検討を行った。その結果、CHO/Aggrus-D48A 株は CHO/Aggrus-WT 株に対して血小板凝集の遅延が生じた。CHO/Aggrus-D82A 株は、血小板凝集は誘導できるものの、CHO/Aggrus-WT 株や CHO/Aggrus-D48A 株に比べて血小板凝集がさらに遅延した。PLAG3 と PLAG4 ドメインの両変異体 CHO/Aggrus-D48A/D82A 株は血小板凝集そのものを誘導することが出来なかった(Fig. 1-5A)。

以上の結果より、PLAG4 ドメインは CLEC-2 と結合し、血小板凝集を誘導する新規 CLEC-2 結合ドメインであることを示した。

考察

CLEC-2 の結合実験によって、PLAG ドメインを欠損させた場合であっても、点変異を導入した場合であっても、PLAG3 ドメインに変異を加えると中程度に CLEC-2 結合能が低下し、PLAG4 ドメインに変異を加えると大幅に CLEC-2 結合能が低下したことから、Aggrus と CLEC-2 の相互作用において、PLAG4 ドメインは PLAG3 ドメインよりも CLEC-2 と強力に相互作用していることが示唆された。更に PLAG3/PLAG4 ドメイン両変異体の結果から、ヒト Aggrus と CLEC-2 の結合は PLAG3 ドメインと PLAG4 ドメインの 2 か所を介していることが示された。

血小板凝集実験では、PLAG ドメイン点変異による血小板凝集誘導活性の違いが CLEC-2 結合能の違いに相関していた。しかし、血小板凝集率については大きな差が無かったことから、Aggrus と CLEC-2 の相互作用の強さは凝集を開始させるまでの時間にのみ影響していることが示唆された。ここで血小板凝集率が 40%程度までしか上昇しないのは、CHO/Aggrus によって誘導される血小板の 1 次凝集のみを観察しているためである。1 次凝集の凝集率はアッセイに用いた血小板数や凝集原によっても変化する。2 次凝集は 1 次凝集によって活性化された血小板からの顆粒の放出を伴って起こる凝集である。顆粒中に含まれるセロトニンや ADP、活性化した血小板で作られるトロンボキサン A₂などの作用によっ

てさらに血小板凝集が進み、巨大な凝集塊が形成される[11]。このアッセイ系で2次凝集が起こると凝集率は90%程度まで上昇する。PLAG3/PLAG4ドメインの同時変異体が血小板凝集を誘導できなかったのは、CLEC-2と結合することが出来ないために血小板にシグナルを伝達出来なかったからと考えられる。他グループの報告では、CLEC-2からの血小板凝集シグナルの伝達にはCLEC-2が集積し、オリゴマー化することによって血小板の活性化シグナルが伝達されることが示されている[53-55]。PLAG3ドメインやPLAG4ドメインの変異が血小板表面においてCLEC-2のオリゴマー化を遅延させたため、血小板内へのシグナル伝達が遅くなり、結果、血小板凝集率は変わらずに血小板凝集をするまでの時間が遅延したと考えられる。

また、Aggrusにおいても、ダイマーすることで血小板凝集を誘導できると報告されている[55,56]。ダイマー化に関わるドメインはAggrusの細胞膜領域に存在する137-GIIVG-141であると言われている。これはGxxxGモチーフがダイマー形成に関わるとの報告[57]から示唆されている。今回の私の実験ではこの細胞膜領域に変異導入はしていないことから、PLAGドメイン変異体間でAggrusダイマー化能に違いは無いと考えられる。

以上をまとめると、PLAGドメインを変異させることによって、Aggrus-CLEC-2結合が弱まり、CLEC-2のオリゴマー化が鈍化し、それに起因する血小板内へのシグナルが減弱したことで血小板凝集が遅延したと考えられる。

Table. 1 アラインメントに用いた42種類のAggrusタンパク質配列のAccession

Binomial name	Accession No.	Binomial name	Accession No.
Homo sapiens	BAD04046.1	Myotis davidii	XP_006766770.1
Gorilla gorilla gorilla	XP_004024751.1	Condylura cristata	XP_004679390.1
Pan paniscus	XP_003806315.1	Trichechus manatus latirostris	XP_004377346.1
Macaca mulatta	XP_001106933.2	Loxodonta africana	XP_010591406.1
Chlorocebus sabaeus	XP_007978670.1	Felis catus	XP_006934362.1
Callithrix jacchus	XP_003733393.2	Ursus maritimus	XP_008692925.1
Tarsius syrichta	XP_008057741.1	Odobenus rosmarus divergens	XP_004397188.1
Tupaia chinensis	XP_006145340.1	Mustela putorius furo	XP_004783770.1
Sus scrofa	XP_005665074.1	Oryctolagus cuniculus	XP_008273589.1
Camelus bactrianus	XP_010955812.1	Ictidomys tridecemlineatus	XP_005317538.1
Vicugna pacos	XP_006197091.1	Chinchilla lanigera	XP_005409948.1
Balaenoptera acutorostrata scammoni	XP_007174997.1	Cavia porcellus	XP_005004460.1
Lipotes vexillifer	XP_007463244.1	Heterocephalus glaber	XP_004850371.1
Physeter catodon	XP_007104886.1	Jaculus jaculus	XP_004649668.1
Bison bison bison	XP_010848362.1	Nannospalax galili	XP_008854276.1
Bos mutus	XP_005889851.1	Rattus norvegicus	NP_062231.1
Bubalus bubalis	XP_006074521.1	Mus musculus	NP_034459.2
Ovis aries	XP_004013851.1	Mesocricetus auratus	XP_005081155.1
Capra hircus	XP_005690878.1	Cricetulus griseus	XP_007606119.1
Panholops hodgsonii	XP_005966349.1	Peromyscus maniculatus bairdii	XP_006975508.1
Eptesicus fuscus	XP_008146423.1	Microtus ochrogaster	XP_005352936.1

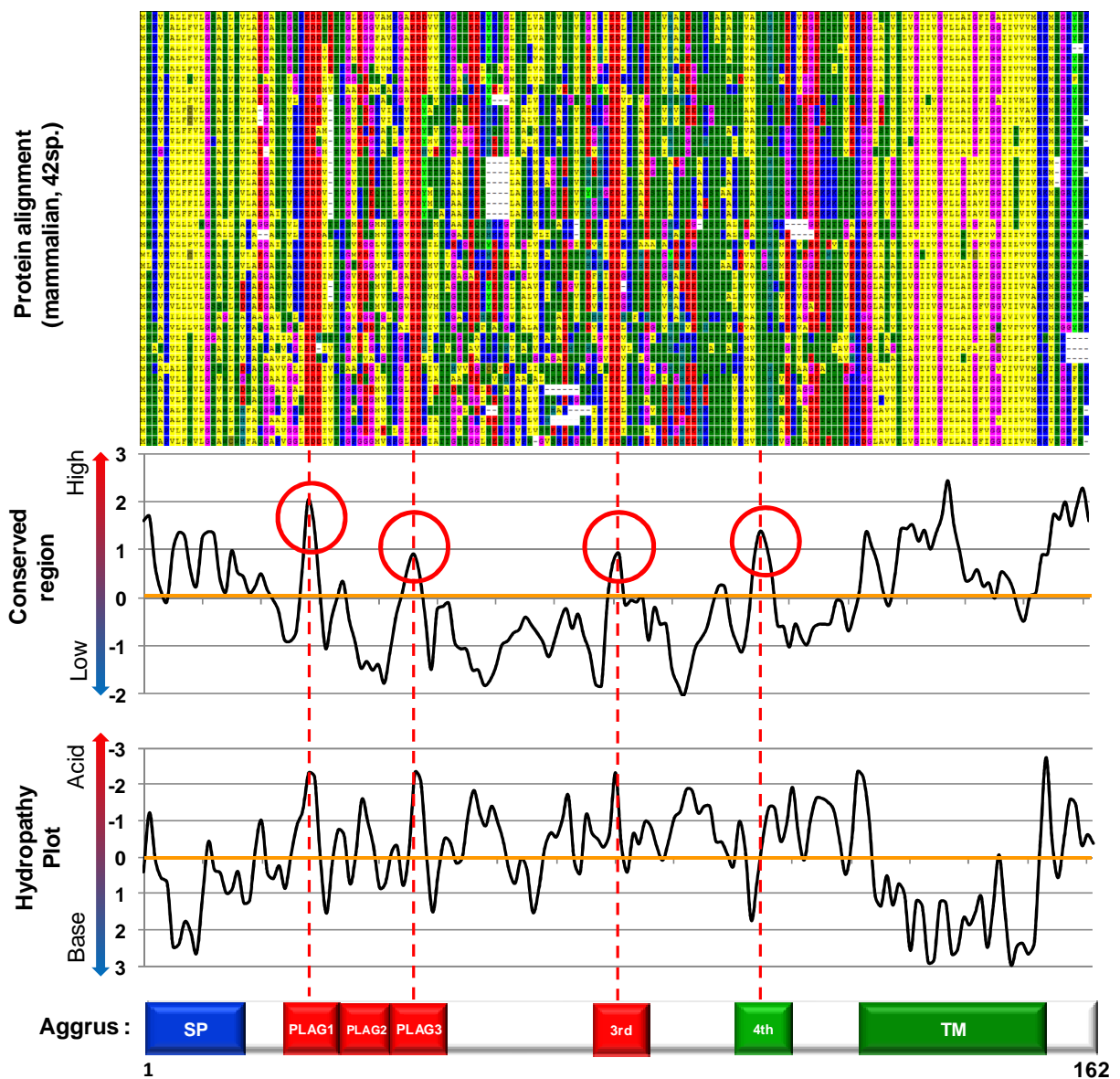


Fig. 1-1 マルチプルアラインメントとSliding window解析

哺乳類42種類のAggrusタンパク質配列からマルチプルアラインメントを作成し、保存領域の検索、親水性プロットをSliding window解析で行った。解析はどちらもWindow size = 3 AAで行った。



Fig. 1-2 3番目の保存領域はPLAGドメインに類似した配列パターンを持つ

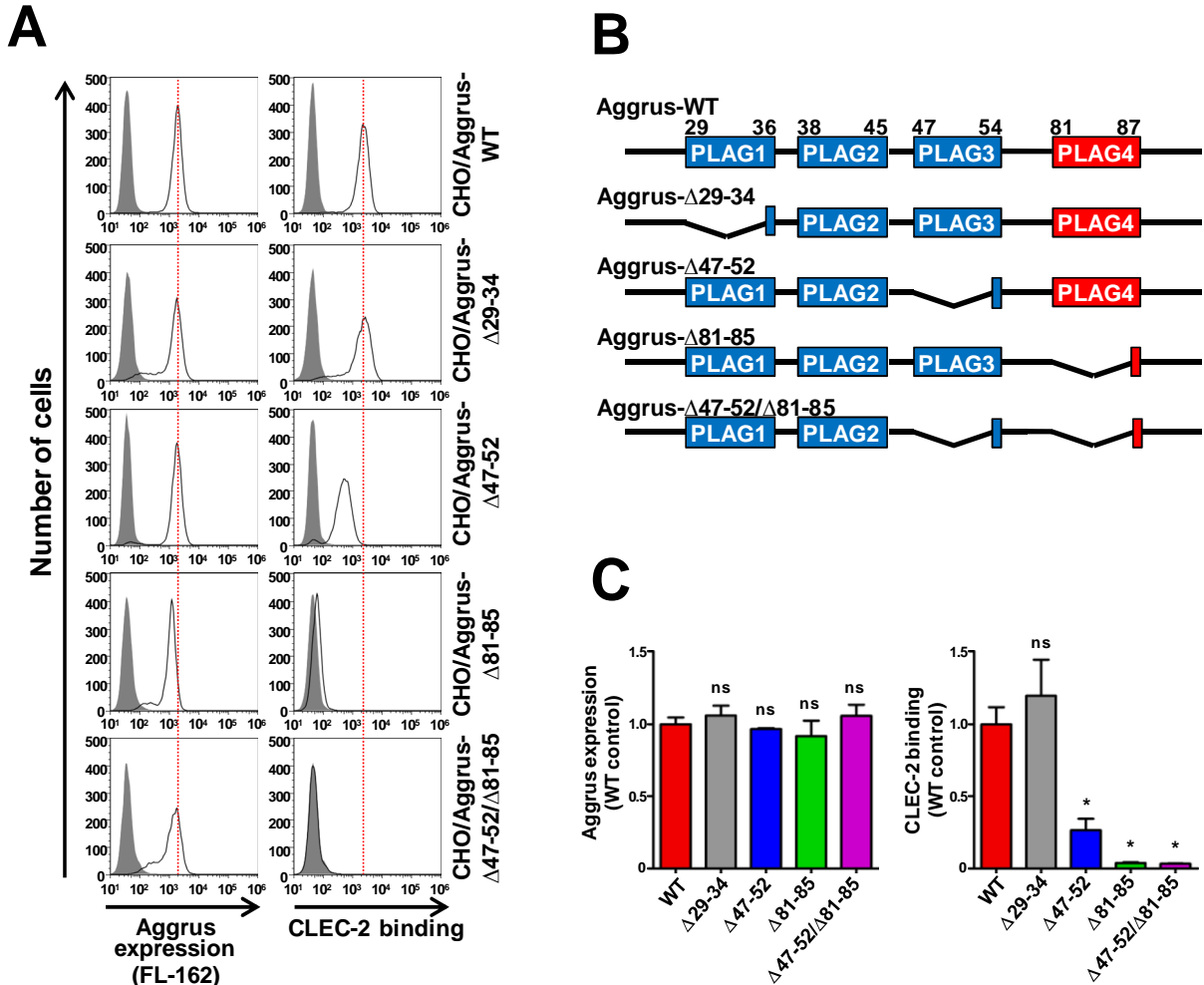


Fig.1-3 PLAGドメイン欠損変異AggrusとCLEC-2の相互作用解析

A. PLAGドメインを欠損したAggrusを発現するCHO細胞を作製し、CLEC-2との結合をFACSで評価した。B. PLAGドメイン欠損変異の模式図。C. FACS解析のヒストグラムのピークを定量化し、統計解析を行った(N = 3)。統計解析はMann-Whitney U testを実施した。* $P < 0.05$

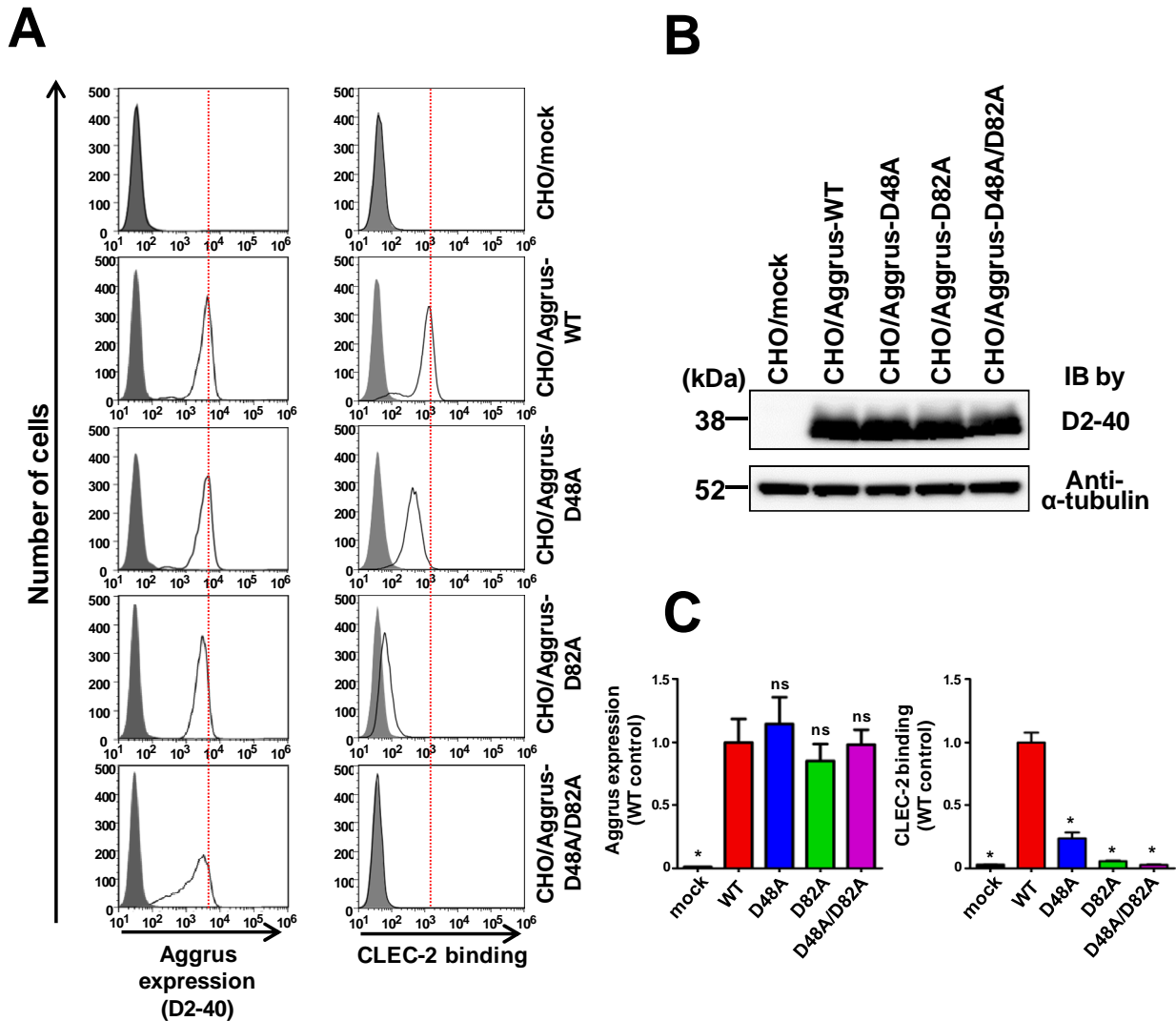
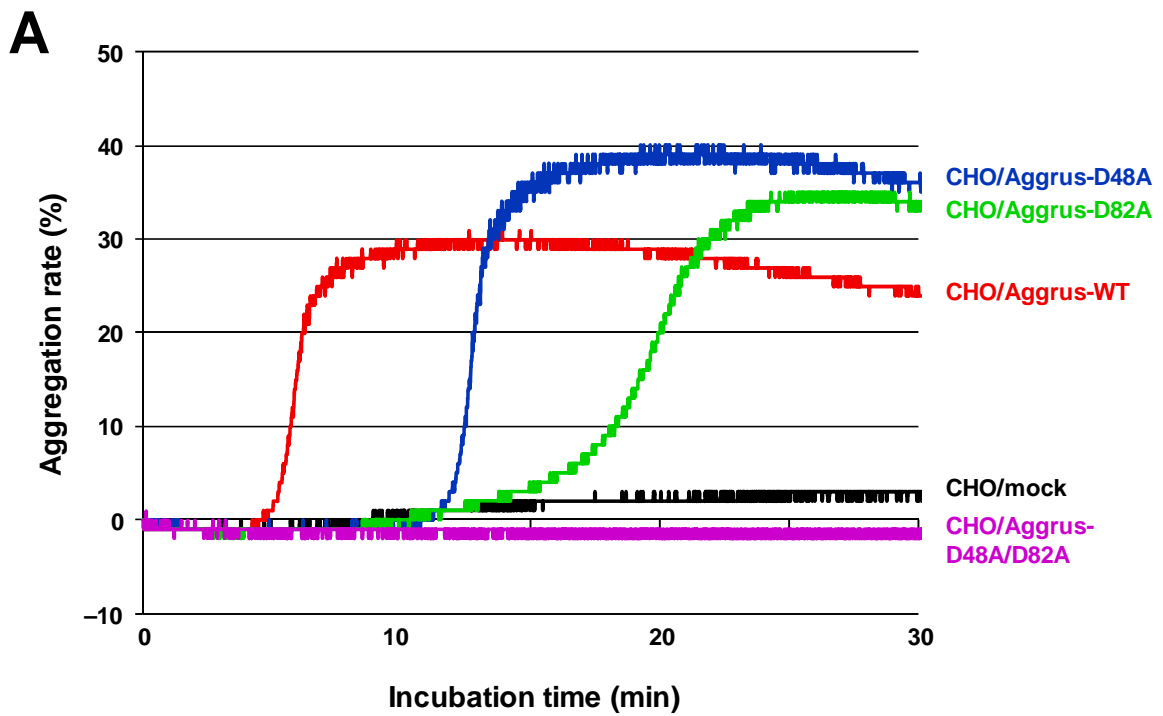


Fig. 1-4 PLAGドメイン点変異AggrusとCLEC-2の相互作用解析

A. PLAGドメインのCLEC-2との結合に重要なアスパラギン酸に点変異を導入したAggrusを発現するCHO細胞を用い、CLEC-2との結合をFACSで評価した。B. 実験に用いた細胞を用いWBを行った。C. FACS解析のヒストグラムのピークを定量化し、統計解析を行った(N=3)。統計解析はMann-Whitney U testを実施した。* $P < 0.05$



B

Revisited PLAG consensus: **E D(X)X X T**

PLAG1	29 –	E D D T E T T G	– 36
PLAG2	38 –	E G G V A M P G	– 45
PLAG3	47 –	E D D V V T P G	– 54
PLAG4	81 –	E D – L P T S E	– 87

Fig. 1-5 PLAGドメイン点変異Aggrusの血小板凝集誘導活性

A. PLAGドメインのCLEC-2との結合に重要なアスパラギン酸に点変異を導入したAggrusを発現するCHO細胞を用い、血小板凝集実験を行った。B. 4つのPLAGドメイン配列を、再定義したPLAGドメインのコンセンサス配列ED(x)xxTとアラインメントした。

1-2. Aggrus と CLEC-2 の結合解析

1-2-1. PLAG ドメイン変異体の作製

ここでは Aggrus の変異体細胞のクローンの取得過程について記載する。代表して CHO/Aggrus-T85A 変異株を取得した際の方法を記載する。

Aggrus に T85A 変異を導入したプラスミドを作製し、CHO 細胞の親株にトランスフェクションした。G418 によるセレクションを行い、安定発現株を得た。この安定発現株を FACS ARIA II を用いてソーティングし、CHO/Aggrus-WT 細胞の Aggrus 発現量に近い T85A-Aggrus 発現量を有する CHO/Aggrus-T85A 細胞をポリクローナルな状態で得た。このポリクローナルな細胞を用いて Aggrus 発現量と CLEC-2 結合能を評価した(Fig. 1-6A)。次に限界希釈を行い、細胞をクローン化した。クローン化した細胞を増殖させた後、1 次スクリーニングとして Aggrus 発現量を調べ、CHO/Aggrus-WT 細胞と比較を行った(Fig. 1-6B)。Aggrus 野生株と Aggrus 発現量の近いクローンを選び出し、再度 Aggrus 発現量を調べ、CHO/Aggrus-WT 細胞と比較を行った(Fig. 1-6C)。このようにして実験に用いるクローンを選び出した。

1-2-2. PLAG4 ドメインの CLEC-2 との結合に関わるアミノ酸の評価

PLAG4 ドメインが Aggrus の新規 CLEC-2 結合部位であることを示したが、PLAG3 ドメインと同様にグルタミン酸・アスパラギン酸・スレオニンに結合するシアル酸を介して結合しているかどうかは定かでない。これを検証するために上記 3 種類のアミノ酸の点変異体を発現する CHO 細胞を作製し、CLEC-2 との結合能について評価を行った。

Aggrus の PLAG3 ドメイン点変異株 3 株(E47A, D48A, T52A)と、PLAG4 ドメイン点変異株 3 株(E81A, D82A, T85A)を作製し、CLEC-2 との結合の評価を行った。結果、3 つの PLAG3 ドメイン点変異株においては、どの細胞株も CLEC-2 との結合能は野生株に比べて中程度低下した。3 つの PLAG4 ドメイン点変異株においては、どの細胞株においても CLEC-2 結合能は大幅に低下した(Fig. 1-7A, B)。

1-2-3. S86 および保存領域 TSHS の CLEC-2 結合への影響

PLAG4 ドメイン周辺は 79-RIEDLPTSEST-89 という配列をしており、後方に O 型糖鎖修飾が行われうるセリン/スレオニンが集中している。特に T85 の隣にある S86 は、糖鎖が付加していれば PLAG4 ドメイン-CLEC-2 結合への関与が考えられる。このことを踏まえ S86 が CLEC-2 との結合に関与しているかを確かめるべく、S86A 変異 Aggrus を発現する CHO 細胞株(CHO/Aggrus-S86A)を作製し、CLEC-2 との結合能を評価した。また、CLEC-2 との結

合については明らかでなかった Aggrus の 4 番目の保存領域である 106-TSHS-109 に関して、も欠損変異体発現株(CHO/Aggrus- Δ 106-109)を作製し、CLEC-2 との結合能を評価した。

結果、CHO/Aggrus-S86A 株と CHO/Aggrus- Δ 106-109 株は、CHO/Aggrus-WT 株と同等の CLEC-2 結合能を発揮した(Fig. 1-8A, B)。これにより、S86 と 106-TSHS-109 は CLEC-2 との結合に関与していないことを示した。

1-2-4. CMP-シアル酸輸送体欠損 CHO 細胞 Lec2 細胞による CLEC-2 結合能の評価

これまでの結果から、PLAG4 ドメインの CLEC-2 結合活性を複数の Aggrus 変異体を用いて示してきたが、実際に PLAG4 ドメインに PLAG3 ドメインのようにシアル酸が必要かどうかは明らかではない。この検証の為に、CMP-シアル酸輸送体を欠損し、糖鎖にシアル酸修飾を行うことが出来ない CHO 細胞変異株の Lec2 細胞に野生型 Aggrus を発現させ、CLEC-2 との結合を評価した。その結果、Lec2/Aggrus 細胞株は CLEC-2 と結合しなかった(Fig. 1-9)。

考察

PLAG4 ドメインにおいても PLAG3 ドメインと同様に、グルタミン酸・アスパラギン酸・スレオニンが CLEC-2 との結合に重要であることが示された。この結果に加えて、PLAG ドメインにおいて ED(x)xxT が高度に保存されていること、S86 を変異させても CLEC-2 との結合に影響がないこと、S86 の保存性は哺乳類間で低い(28.6%)ことから、Aggrus の PLAG ドメインと CLEC-2 との結合にはグルタミン酸・アスパラギン酸・スレオニンが重要であることを裏付けている。この結果より、私は PLAG ドメインのコンセンサス配列を ED(x)xxT と再定義したい(Fig. 1-5B)。他グループの報告では CLEC-2 の結合部位を形成する 4 か所のアルギニンを 1 か所でも変異させてしまうと Aggrus と全く結合することが出来なくなってしまう[45]ことから、PLAG4 ドメインは PLAG3 ドメインと同様に CLEC-2 の 4 か所のアルギニンを介して結合していると推測される。

PLAG4 ドメインの T85 は変異させることで CLEC-2 との結合能を大幅に低下させることが出来たが、糖鎖修飾の有無は定かではない。もちろんシアル酸の付加があるかも定かではない。T85 が PLAG4 ドメインの立体構造維持に関与している可能性は否定できない。CHO/Aggrus 細胞から精製した Aggrus にエドマン分解を施し、糖鎖結合部位を探索した研究では、T85 に糖鎖修飾は見られない[44,58]。一方でイヌの Aggrus にエドマン分解を施した論文[59]では、T85 に相同な T92 でエドマン分解が起きていないことから、糖鎖の付加が考えられる。機械的に糖鎖の結合を予測できるソフトウェア NetOGlyc 4.0 Server

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) [60]で T85 への糖鎖付加を予測すると、PLAG4 ドメインの T85 は PLAG3 ドメインの T52 とほぼ同等のスコアで糖鎖修飾有りの予測がされる。シアル酸の付加に関して、糖鎖にシアル酸修飾を施すことが出来ない Lec2 細胞[61,62]に Aggrus を安定発現させた Lec2/Aggrus 細胞を用いて、FACS にて CLEC-2 との結合を評価したが、シアル酸の無い Aggrus と CLEC-2 は結合しなかった。PLAG4 ドメインと CLEC-2 との結合にシアル酸が関係ないのであれば Lec2/Aggrus と CLEC-2 との結合は維持されると考えられるが、結合できなくなったという結果は、PLAG4 ドメインにおいても CLEC-2 との結合にシアル酸が必要であることを示唆している。他グループの報告でもこの Lec2/Aggrus 細胞が血小板凝集を誘導できないとの報告がある[37,43]ことから PLAG4 ドメインにシアル酸が無いと CLEC-2 との結合、血小板凝集の誘導ができないことが示唆される。T85 の詳細な糖鎖解析は今後行っていく。

PLAG4 ドメインの方が PLAG3 ドメインよりも強力に CLEC-2 と結合すると前述したが、これには詳細な検討が必要だと考えられる。PLAG3 ドメインの配列は 47-EDDVVT-52 であり、PLAG4 ドメインの配列は 81-EDLPT-85 である。配列の違いや、PLAG4 ドメインの方が 1 アミノ酸分短いこと、PLAG4 ドメインには立体構造の自由度を低下させるアミノ酸であるプロリンがあること[63]など、両ドメイン間で CLEC-2 とのフィッティングは異なるだろう。PLAG4 ドメインと CLEC-2 の結晶構造解析や直接的な結合エネルギーの測定を実施できれば、正確な結合強度の比較を行えると考える。

106-TSHS-109 配列の保存度は高いが CLEC-2 との結合には関与していなかった。BLAST 検索により、この配列は細胞膜に発現しているタンパク質やムチンに見られることが分かった。先に挙げた Mucin-12 も Mucin-3A も膜貫通型のムチンであることから、Aggrus が膜貫通型ムチン様の表現系を発揮する際に機能できるかもしれない。あるいは、TSHS 配列が膜貫通型タンパク質において、糖鎖修飾がなされやすいコンセンサス配列なのかもしれない。

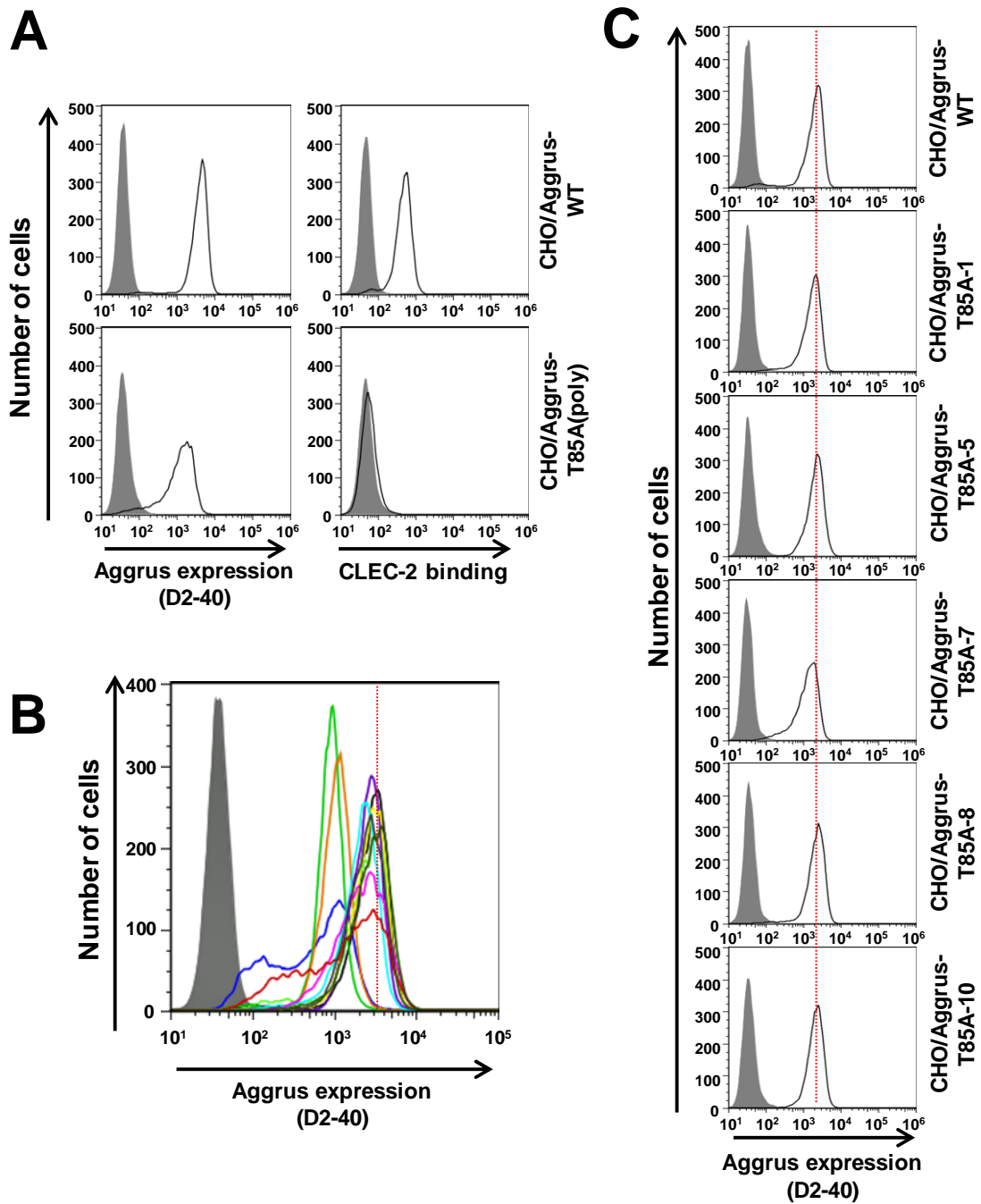


Fig. 1-6 PLAGドメイン変異体Aggrus発現CHO細胞の作製手順

A. ポリクローナルなCHO/Aggrus-T85A細胞のAggrus発現量及びCLEC-2結合能を評価した。B. 限界希釈した細胞のAggrus発現量の評価した。赤い点線はAggrus-WTの発現ピーク値を示す。C. クローン化したT85A細胞株のAggrus発現量を評価した。

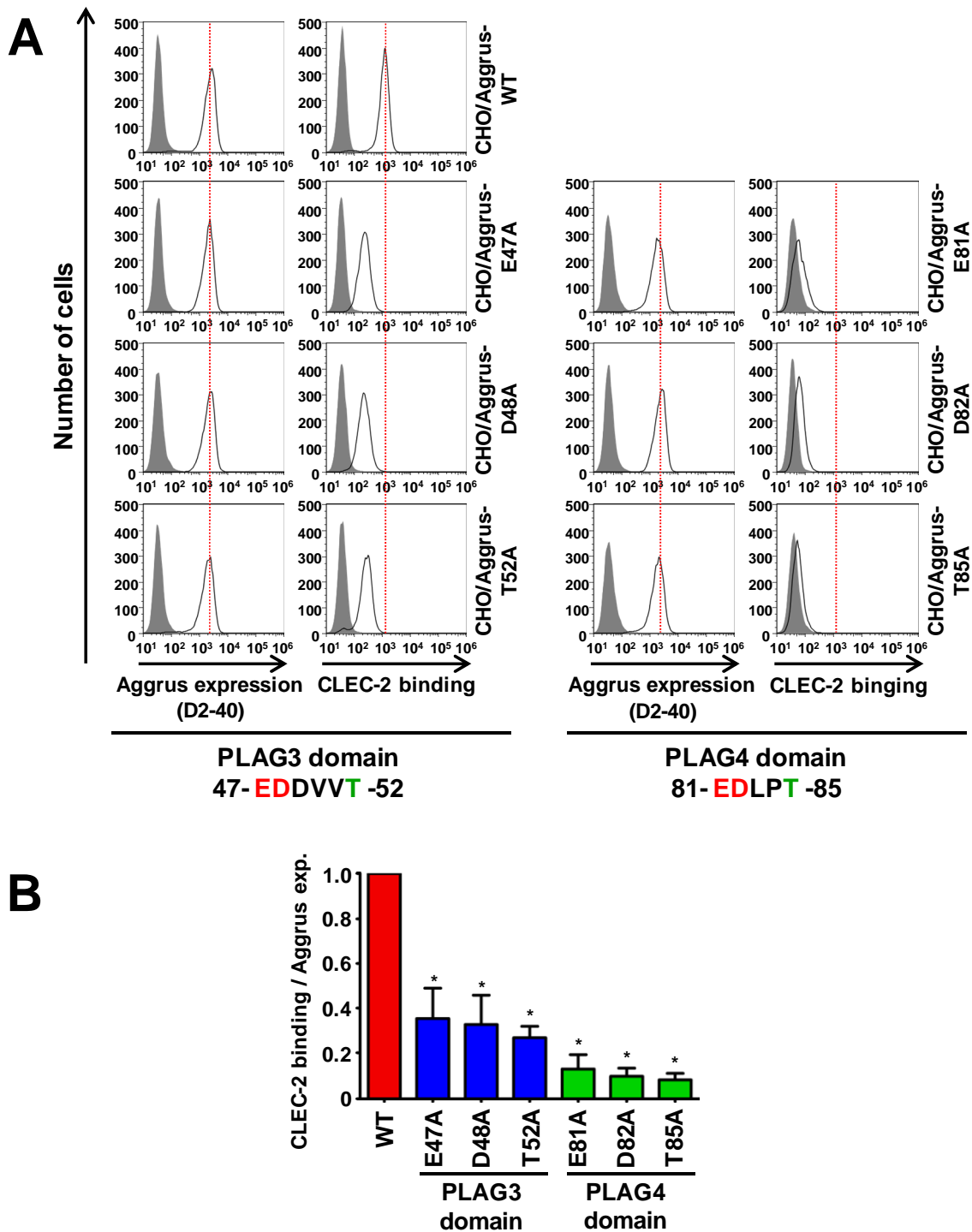


Fig. 1-7 PLAGドメインのED(x)xxTがCLEC-2との結合に影響する

A. PLAG3/PLAG4ドメインのグルタミン酸、アスパラギン酸、スレオニンにアラニン点変異を導入し、CLEC-2との結合をFACSで評価した。B. FACS解析のヒストグラムのピーク値を定量化し、統計解析を行った(N=3)。縦軸はCLEC-2 bindingの数値をAggrus expressionの数値で割った値を示している。統計解析はMann-Whitney U testを実施した。* $P < 0.05$

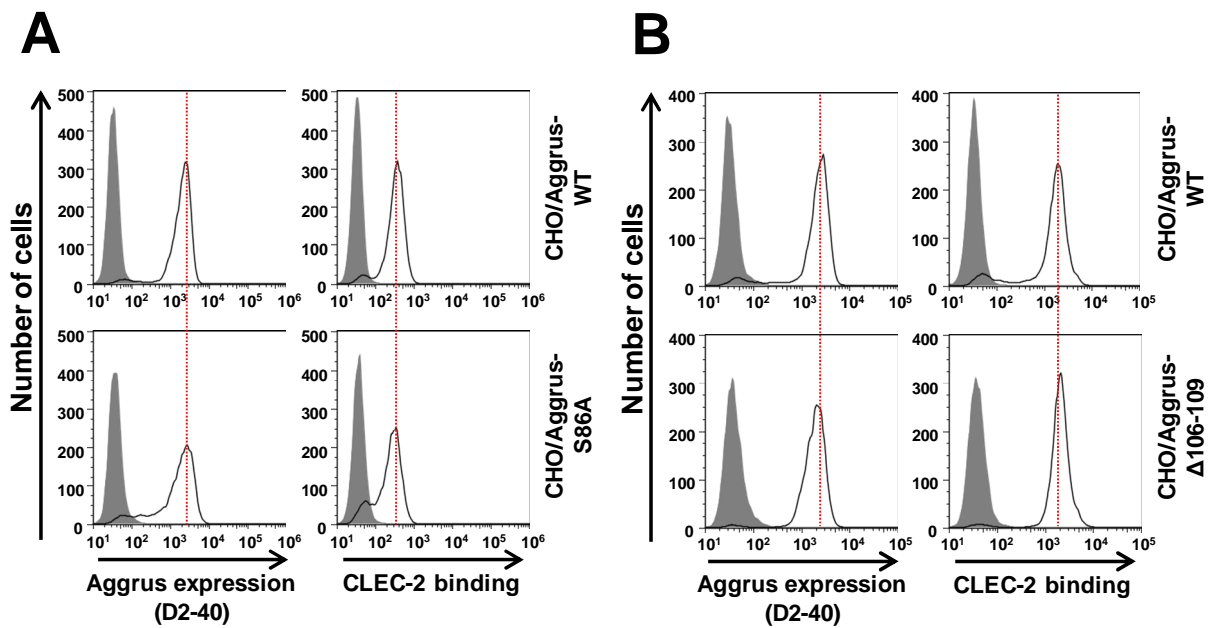


Fig. 1-8 S86と第4の保存領域106-TSHS-109はCLEC-2との結合に影響しない

A. PLAG4ドメイン近傍で糖鎖付加の可能性のあるS86に点変異を導入したAggrusを発現するCHO細胞を用い、CLEC-2との結合をFACSで評価した。B. 第4の保存領域である106-TSHS-109を欠失変異させたAggrusを発現するCHO細胞を用い、CLEC-2との結合をFACSで評価した。

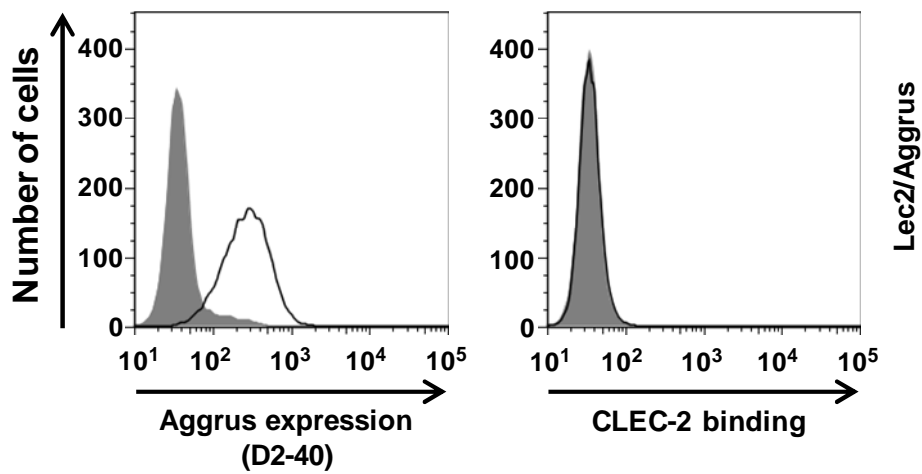


Fig. 1-9 Lec2/Aggrus細胞はCLEC-2と結合しない
 CMPシアル酸輸送体欠損CHO細胞Lec2にAggrusを発現させた
 Lec2/Aggrus細胞を用い、CLEC-2との結合をFACSで評価した。

第二章 PLAG4 ドメインに対する中和抗体の作製とその性質

目的

新たに発見した PLAG4 ドメインにおいても PLAG3 ドメインと同様に MS-1 抗体や P2-0 などの中和抗体によって直接 CLEC-2 との結合を阻害できるのかを明らかにするため、PLAG4 ドメインを標的とする中和抗体の作製を行った。この章の前半では主に実験方法について記載する。後半では作製した抗体の性質について評価する。

2-1. 抗体の作製

2-1-1. 抗原の作製

PLAG4 ドメインに対する抗体の作製に際し、私はペプチド抗原をマウスの免疫に用いた。高い抗原性と PLAG4 ドメインへの特異性を持った抗体を創出するために、ペプチド抗原をタンデムにつなげたリコンビナントタンパク質を抗原として用いた。キャリアータンパク質としては GST を用いた。

ペプチド抗原は PLAG4 ドメイン配列“RIEDL”を中心に、3', 5'の両方向に伸長した配列 76-TGIRIEDLPTSEST-89 を選択した。その理由は、ペプチドを抗原にする際にペプチドの両端を認識する抗体が作られにくいためである。また、この設計方法で当研究室において部位特異的な抗体作製に成功した実績もあるため、この方法および配列を選んだ。このペプチドの遺伝子を Integrated DNA Technologies (IDT)社で人工合成した。人工合成した配列は BamH1-(抗原配列遺伝子)*4-Bgl2 である。制限酵素サイト BamH1 と Bgl2 は共に付着末端であり、切断後の突出した塩基配列が相同であるため、リガーゼにより接続することが出来る。また接続後は BamH1 と Bgl2 それぞれの制限酵素で切断が出来ない。この特性を利用してベクターの切断とインサートの結合を繰り返し、抗原配列遺伝子のリピート数を 12 回または 40 回まで増やした。この遺伝子を BamH1 と Bgl2 で切り出し、pGEX6P-3 ベクターへ載せ替えた(Fig. 2-1A)。pGEX ベクターには GST 遺伝子が乗っている。GST 遺伝子の C 末側にマルチクローニングサイトがあるため、遺伝子をこのベクターにクローニングするだけで GST 融合遺伝子発現プラスミドが作製できる。作製したタンデム抗原発現ベクターで大腸菌株 BL21 を形質転換し、融合タンパク質を大量発現させた。12 回タンデム、40 回タンデムの GST 融合リコンビナントタンパク質をセファロースビーズでバッチ精製した(Fig. 2-1B)。

2-1-2. マウスへの免疫

BALB/c マウス 5 匹に対して抗原の免疫を行った(Fig. 2-2)。投与スケジュールは(Table. 2-1)に記載した。免疫中のマウスの抗体価の測定はマウスの抗血清を用いて ELISA で評価した(Fig. 2-3)。研究室で用いられていた ELISA 用の 2 次抗体が劣化していたため、測定値の上昇を判断しかねていたが、二次抗体を変更したことで十分な抗体価の上昇、またリコンビナント Aggrus タンパク質への結合性も正確に確認することが出来た(Fig. 2-4)。

2-1-3. ハイブリドーマの作製およびスクリーニング

マウスの脾臓から脾細胞を抽出し、マウスのミエローマである P3U1 細胞と細胞融合を行った。融合の後、96well プレートにまき、HAT 選択を行った。

ハイブリドーマの培養上清にはハイブリドーマが産生する抗体が分泌されており、この抗体の活性を ELISA で評価することで抗原に反応性の高い抗体を産生するハイブリドーマの存在する well を選択することが出来る。細胞融合から 10 日後のハイブリドーマの培養上清を用いて ELISA を行った(Fig. 2-5)。そして抗原ペプチドに反応性の高い well を選び出し、選択した well のハイブリドーマを限界希釈法にてシングルクローン化した。

2-1-4. 培養上清を用いた PLAG4 ドメイン特異性の評価

ハイブリドーマの培養上清を用いて FACS を行った。ハイブリドーマの産生する抗体が免疫に用いた抗原ではなく、細胞膜表面に発現している Aggrus に結合することが出来るかを確かめた。この際に CHO/Aggrus-WT 細胞株に加えて CHO/Aggrus-D82A 細胞株を用いた。WT 株に強力に反応し、D82A 変異株で結合能が低下する抗体を PLAG4 ドメイン特異的な抗体として評価した(Fig. 2-6)。

以上により選ばれたハイブリドーマ 1-7, 2-2 株から生成される抗体を、PLAG4 特異的な抗体”PLAG4 domain antibody”の意味を込めて、PG4D1, PG4D2 と命名した。

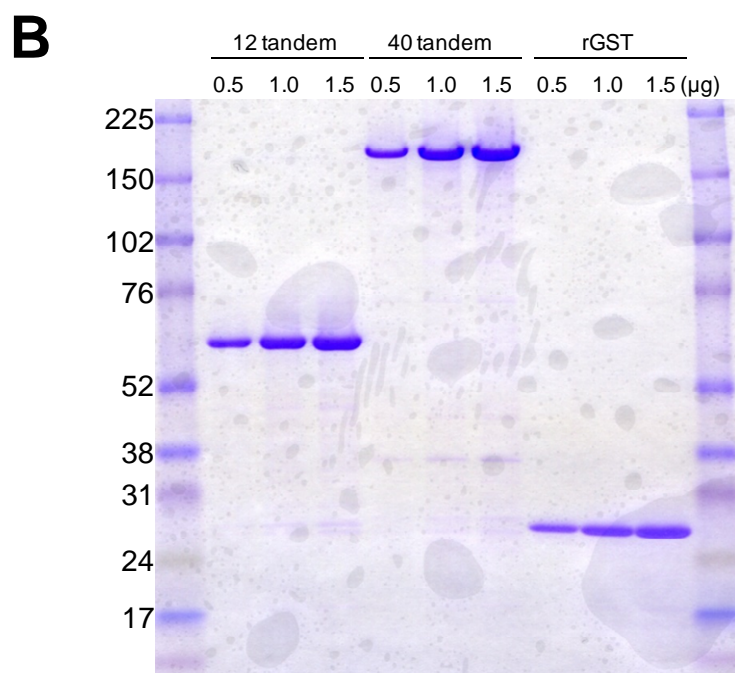
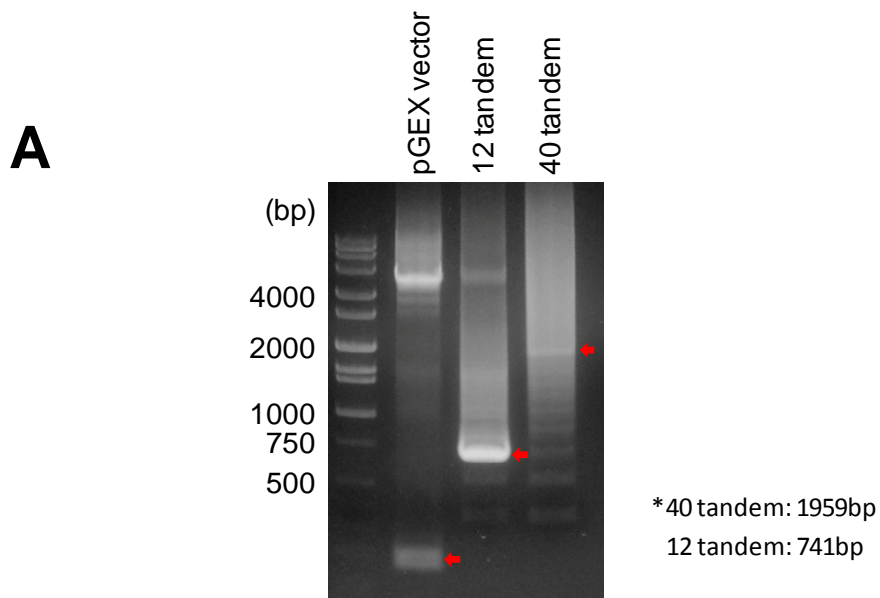


Fig. 2-1 PLAG4ドメインタンデム抗原の作製

A. pGEX6P-3ベクターに導入したタンデム抗原遺伝子をPCRにて検出した。B. 大腸菌から大量精製した抗原を0.5、1.0、1.5 µgずつSDS-PAGEし、純度および濃度を確認した。

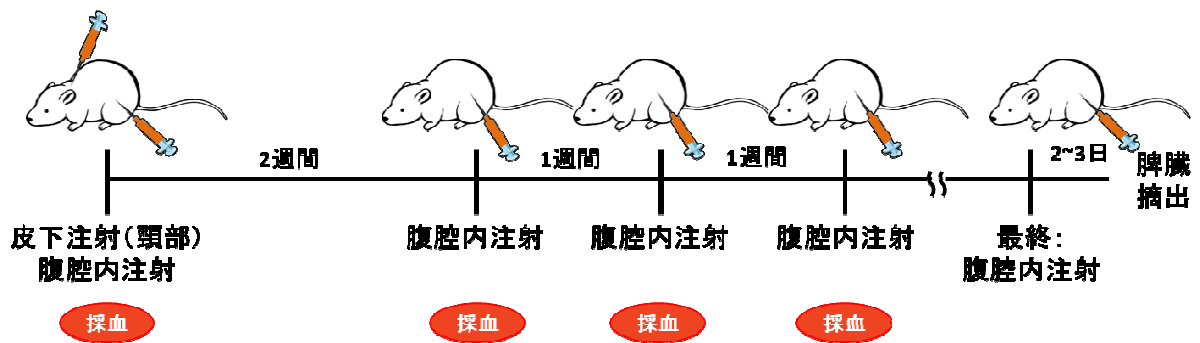


Fig.2-2 マウスへの抗原投与のタイムコース

マウスへの抗原の投与、および採血実施のタイムコース。実際の投与日時はTable. 2-1にまとめた。

Table. 2-1 マウスへの抗体投与スケジュール

1回目の抗体投与をDay0として、免疫のスケジュールをまとめた。Emulsionはエマルジョンを免疫したことを示す。LiquidはエマルジョンではなくPBSに融解している抗原をそのまま投与したことを示す。またBoostは脾臓摘出前に免疫を行ったことを示す。

Day	Immunization	Mouse	Status
0	Emulsion	All	
14	Emulsion	All	
21	Emulsion	All	
31	Liquid	All	
38	Emulsion	All	
45	Emulsion	All	
52	Liquid	All	
59	Liquid	All	
60	Liquid	No. 2, 3, 4, 5	
63	Boost (I.V.)	No. 3	Day64: Death
67	Liquid	No. 1	
	Boost (I.P.)	No. 5	Day68: Survive
71	Boost (I.P.)	No. 4	
89	Emulsion	No. 1, 2	
105	Emulsion	No. 1, 2	
110	Boost (I.P.)	No. 2	
125	Liquid	No. 1	

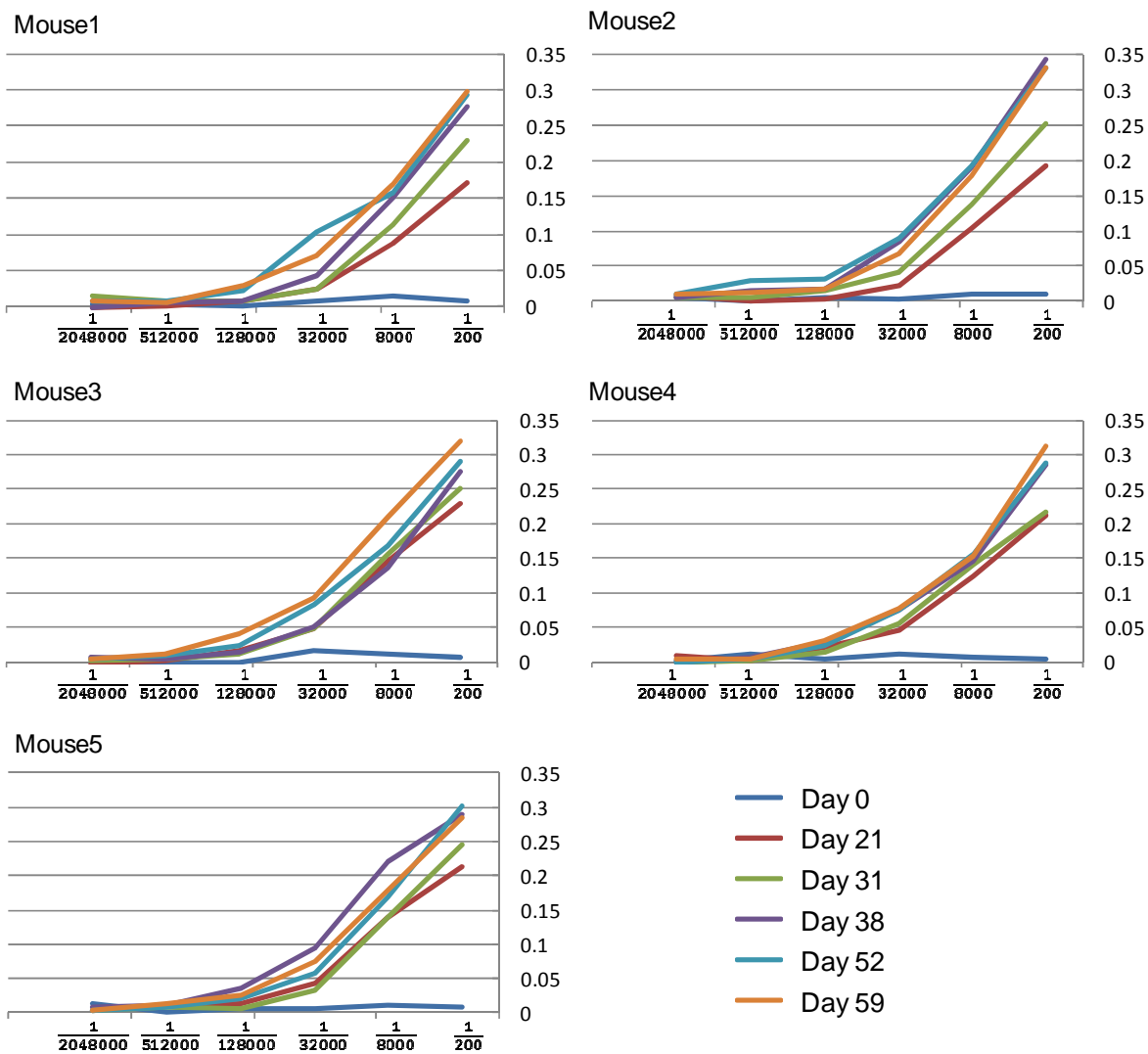


Fig. 2-3 各マウスの抗体価の上昇度
 マウス血液より得た抗血清を用いてELISAを行った。横軸は抗血清の希釈率、縦軸は450 nmにおける吸光度を示す。

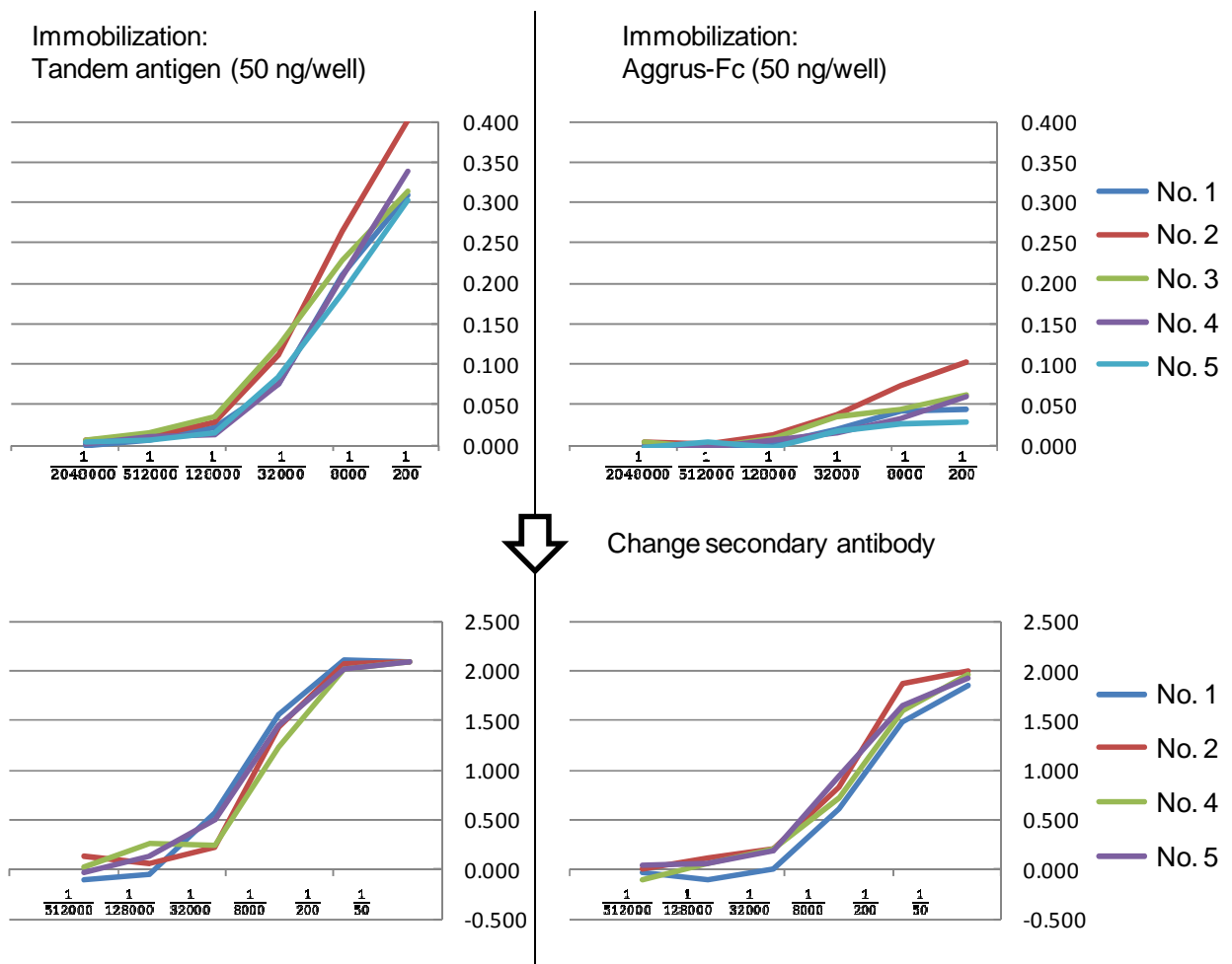


Fig. 2-4 リコンビナントAggrusに対する反応性および2次抗体の変更

Day59のマウス抗血清を用いて抗原に対する反応性およびリコンビナントAggrusタンパク質に対する反応性をELISAで評価した。また2次抗体を変更し、同様にDay59抗血清を用いて反応性を評価した。横軸は抗血清の希釈率、縦軸は450 nmにおける吸光度を示す。

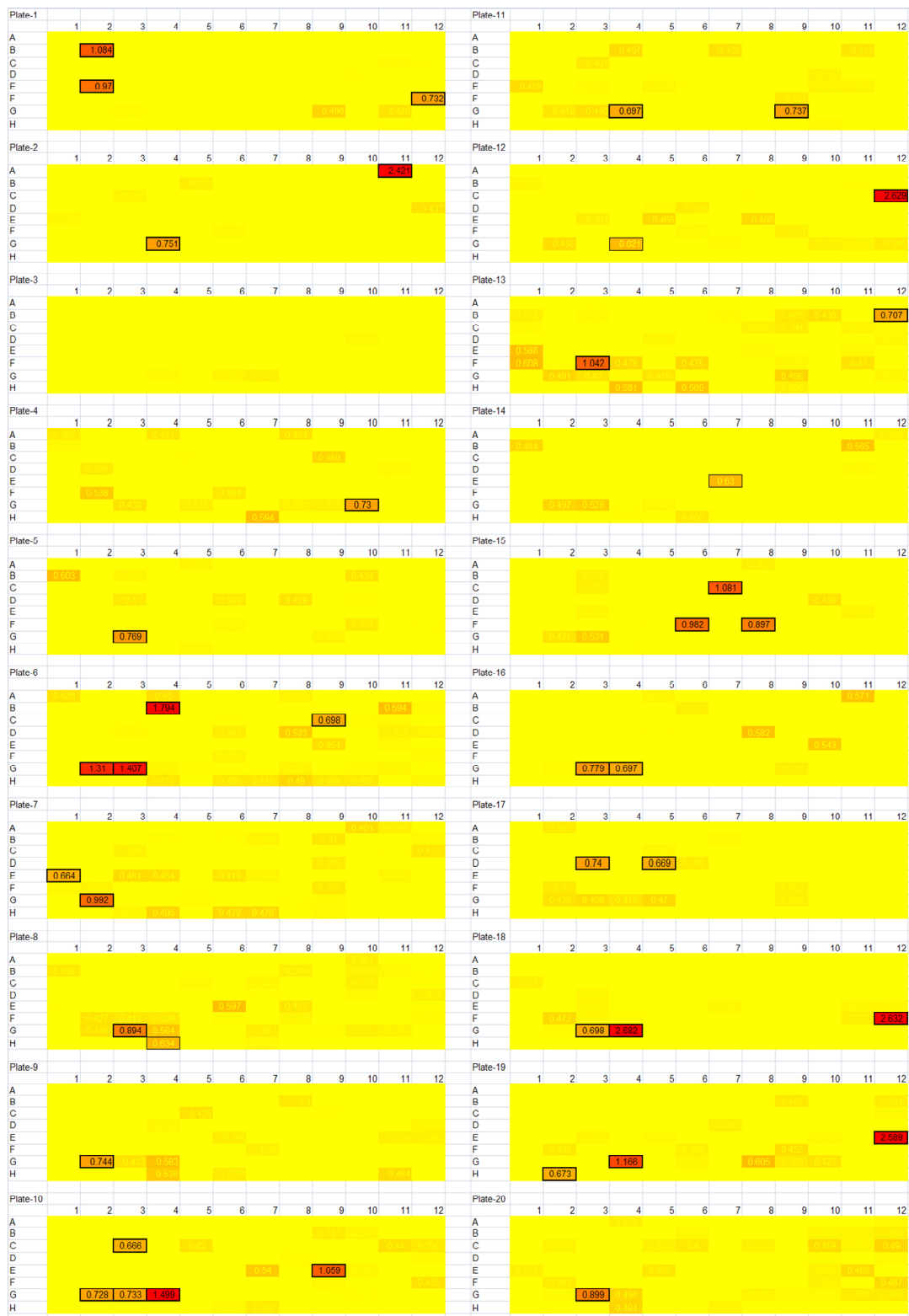


Fig. 2-5 マウスNo.2から作製したハイブリドーマのスクリーニング
 ハイブリドーマの培養上清を用いてELISAを行った。黄色のwellは吸光度の値が小さく、赤色のwellは吸光度の値が大きいことを示す。

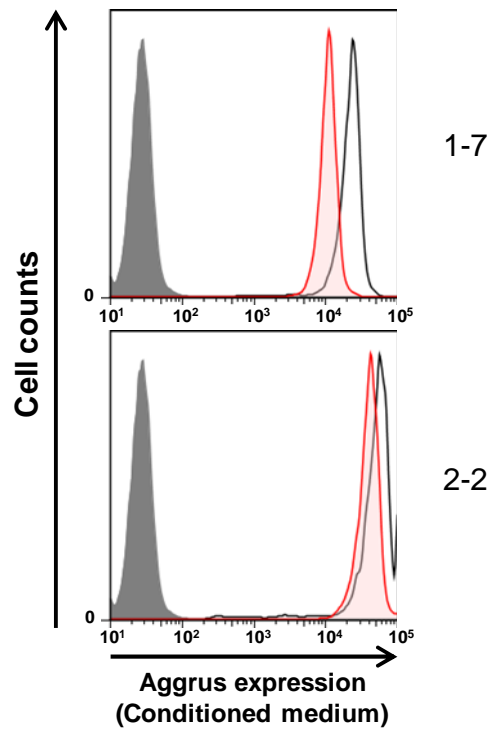


Fig. 2-6 培養上清を用いたFACS

限界希釈したハイブリドーマの培養上清を用いてFACSを行った。CHO/Aggrus-WT細胞(open area)、CHO/Aggrus-D82A細胞(red area)の2種類を用い、Aggrusに対する高い反応性、PLAG4ドメインに対する特異性を評価した。

2-2. 抗体の性質

2-2-1. マウス腹水からの抗体の精製

PG4D1 抗体、PG4D2 抗体産生ハイブリドーマを BALB/c-*nu/nu* マウスの腹腔に移植し、腹水を作らせた。この腹水から抗体を精製した。これらの抗体を用いて抗体の性質を評価した。

2-2-2. ウェスタンブロット法によるエピトープの決定と PLAG4 ドメイン特異性の評価

Alanine Scan 法により抗体のエピトープを決定した。Alanine Scan 法とは抗体のエピトープなどを決定するために、タンパク質のアミノ酸を1文字ずつアラニンに置換して反応性を評価する実験方法である。抗原として用いた箇所 76-TGIRIEDLPTSEST-89 のアミノ酸を1文字ずつアラニンに置換した GST 融合 Aggrus タンパク質(Aggrus- Δ N24)を大腸菌に発現させ、ライセートを作製し、WB 法にてエピトープを決定した。結果、PG4D1 抗体、PG4D2 抗体は共に 79-RIEDL-83 をエピトープとすることが分かった(Fig. 2-7A)。次に精製した抗体のアイソタイプを決定した。結果、PG4D1 抗体は IgG1、PG4D2 抗体は IgG2a であることが分かった。PLAG ドメインの欠損変異体 Aggrus を発現する CHO 細胞のライセートを用いて WB を行ったところ、PG4D1 抗体、PG4D2 抗体は共に PLAG3 ドメイン欠損変異体は認識できるものの、PLAG4 変異体は認識できないことを確かめた(Fig. 2-7B)。同様に PLAG ドメインの点変異体を発現する CHO 細胞のライセートを用いて WB を行ったところ、両抗体共に D48A 変異体を認識した。一方で PG4D1 抗体は D82A 変異体を認識できないのに対し、PG4D2 抗体は D82A 変異体を弱くではあるが認識できることが分かった(Fig. 2-7C)。これはアラニンスクランの結果に一致した。欠損変異/点変異の細胞を用いた WB において、31 kDa 付近に新たな Aggrus のバンドを確認した。

2-2-3. Surface plasmon resonance (SPR)解析による解離定数の算出

SPR 解析により、抗体の結合速度定数、解離速度定数を決定した。センサーチップに Aggrus-Fc タンパク質を固定した後、チップ上に抗体を流して測定を行った。測定ではセンサーチップ上を抗体・バッファーの順に5回連続して流すことでセンサーグラムを得た。結果、PG4D1 抗体、PG4D2 抗体共にほとんど同じセンサーグラムを示した(Fig. 2-8)。測定データの解析により、結合速度定数 k_a は共に 3.0×10^4 と求められた。解離速度定数は共に検出限界以下($k_d \leq 1 \times 10^{-5}$)であったため、正確な数値は測定することが出来なかった。これらの定数値より解離定数 K_D の値を算出すると、 3.3×10^{-10} M 以下と見積もられた。

2-2-4. Flow cytometry による Aggrus の検出

Flow cytometry を用いて、内在的に Aggrus を発現する様々ながん細胞に対して PG4D1 抗体、PG4D2 抗体の反応性を評価した。初めに CHO/mock 細胞と CHO/Aggrus-WT 細胞に対して実施したところ、CHO/mock 細胞への反応性が見られないことを確認した(Fig. 2-9A)。次に肺がんの細胞株である H226 細胞と PC-10 細胞への反応性を見た所、MS-1 抗体よりはヒストグラムの移動度が小さいものの、よりシャープなヒストグラムを PG4D1 抗体、PG4D2 抗体共に検出することが出来た(Fig. 2-9B)。最後に他部位の扁平上皮がんや肉腫に対する反応性を見た。結果、食道がんの KYSE70 細胞や膀胱がんの UM-UC-5 細胞、線維肉腫の HT1080 細胞と、いずれの細胞でもシャープなヒストグラムを検出することが出来た。特に UM-UC-5 細胞は MS-1 抗体が認識できない(認識が非常に弱くなる)細胞であったが、PG4D1 抗体と PG4D2 抗体は認識できることが明らかになった。

2-2-5. PG4D2 抗体のオフターゲット

PG4D1 抗体と PG4D2 抗体は共にヒト Aggrus の 79-RIEDL-83 を認識することを示したが、この配列を持つタンパク質はオフターゲットになる可能性がある。この検証の為、RIEDL 配列を NCBI の Protein BLAST で検索を行った。プレフィックスが NP から始まる配列に限定、Taxon を *Homo sapiens* に限定し、検索した結果を表に示した(Table. 2-2)。タンパク質の性質・局在等の情報から、von Willebrand factor (vWF)に着目した。vWF を発現するヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC 細胞からライセートを作成し、WB を行った。Aggrus 発現のポジティブコントロールとしては PC-10 細胞のライセートを用いた。結果、PG4D2 抗体は WB で vWF を認識できることが確かめられた(Fig. 2-10A)。次に vWF は生理条件下で非常に大きな多量体構造を取ることが知られているため、この構造の vWF に PG4D2 抗体が結合できるかを確かめるべく、ヒト血漿を用いた免疫沈降実験を行った。健常人の血液より血漿を取得し、これにコントロール抗体、PG4D2 抗体、2 種類の vWF のポリクローナル抗体(ab7356, H-300)を加え、免疫沈降を行った。結果、PG4D2 抗体では Input や vWF 抗体で確認できる vWF のバンドが確認できなかった(Fig. 2-10B)。この結果から、生理条件下の vWF には PG4D2 抗体はほとんど結合しないことが示された。最後に、マウス vWF に対する PG4D2 抗体の反応性を配列相同性の面から検討した。ヒト Aggrus・vWF およびマウス Aggrus・vWF のタンパク質配列のうち”RIEDLPT”配列近傍をアラインメントした(Fig. 2-10C)。ヒトにおいては Aggrus・vWF 共に”RIEDLPT”が完全に相同だが、マウスにおいては”RIEDL”に対して、Aggrus で 3 文字のミスマッチ、vWF で 2 文字のミスマッチであり、抗体との結合しな

いことが示唆された。

2-2-6. WB で確認できる低分子量 Aggrus に対する検討

Aggrus を発現する CHO 細胞を PG4D1 抗体または PG4D2 抗体で WB すると、既知の 38 kDa/25 kDa のバンドに加えて 31 kDa に新たなバンドが確認できる(Fig. 2-7B, C)。この低分子量 Aggrus について検討を行った。

初めに Aggrus のアイソフォームについて検討した。NCBI にはプレフィックスが NP から始まる Aggrus (podoplanin)のアイソフォームは 4 種類登録されている。開始メチオニンの違いで 2 種、C 末の多様性で 2 種あり、組み合わせで合計 4 種類である(Fig. 2-11A)。全長の長い Aggrus (Isoform A)がこの研究で利用しているタンパク質配列であり、CHO 細胞に発現させると 38 kDa にバンドが出ることをこれまで様々な抗体で検証してきた(Fig. 0-3, 2-7)。新たに PG4D1 抗体と PG4D2 抗体で検出されてきたバンドが、短いアイソフォームのタンパク質であるかを検証すべく、開始メチオニンをアラニンに点変異(M43A)した Aggrus を CHO 細胞に一過性に発現させ、WB にて評価した。結果、PG4D2 抗体では Aggrus-WT 発現株と同様に Aggrus-M43A 変異株においても 31 kDa のバンドを検出することが出来た(Fig. 2-11B)。NZ-1 抗体は M43 をエピトープとしており、M43A の変異体 Aggrus には全く結合できないことが示されている[64]。以上の結果より、M43 から始まるアイソフォームの Aggrus を PG4D1/PG4D2 抗体が検出しているわけではないことを示した。最後に 31 kDa の Aggrus が細胞膜に発現しているかについて検証を行った。Aggrus を内在性に発現する MG63 細胞の細胞表面に発現しているタンパク質をビオチン化し、マウス Control IgG 抗体、PG4D2 抗体、NZ-1 抗体で免疫沈降した。WB を行い、HRP を結合した Avidin でバンドの検出を行ったところ、IP: PG4D2 では 38 kDa のバンドに加えて、31 kDa のバンドが確認できた(Fig. 2-11C)。IP: NZ-1 では 38 kDa のバンドのみ確認できた。以上の結果より、PG4D1/PG4D2 抗体で特異的に検出できる 31 kDa のバンドは細胞表面に発現していることを示した。

考察

取得した PG4D1 抗体、PG4D2 抗体は共に似通った性質を示していたが、アイソタイプが異なることや、FACS、WB での反応性が若干異なることから別のクローンであることは間違いない。ただし、どちらの抗体も同じマウス由来の脾細胞であることから、マウス体内で B 細胞の成熟過程で違うクローンに成熟したと考えられる。偶然であるが他グループも PLAG4 ドメインに対する抗体 LpMab-7 を取得しており、その抗体のエピトープは

79-RIEDL-83 である[65]。このことから、これまで見出されてこなかった PLAG4 ドメインではあるが、抗原性の高い部位であることが伺える。

PG4D1 抗体、PG4D2 抗体の Aggrus に対する反応性は SPR 法から、非常に強力であることが分かった。チップ上にバッファーのみを流すウォッシュの際に、全くと言っていいほどレスポンスユニットの低下が見られないことから、チップに固定した Aggrus に結合した抗体がほとんど剥がれないことが読み取れる($kd \leq 1 \times 10^{-5}$)。これは PG4D1 抗体・PG4D2 抗体が Aggrus に結合した際に、ほとんど剥がれない性質を有していることを示しており、PLAG4 ドメインに不可逆的に結合できることが示唆される。反面、Aggrus との結合しやすさ(結合速度定数)は低いため、Aggrus と反応するまでの時間がかかってしまうことが考えられる。これを改善するためには、抗体の濃度を上げる必要があることが示唆される。SPR 法以外の実験系で反応性について評価すると、FACS での反応性は非常に良好であった。MS-1 抗体の結合度が低下してしまう UM-UC-5 のような細胞であっても結合することが出来る。またデータは示していないが、蛍光免疫染色や IHC において、既存の抗体よりも強く Aggrus を認識できることから、診断などにも有効な可能性が高い。これに関しては先に紹介した LpMab-7 抗体も IHC で使用した際に、転移巣の Aggrus を既存の抗体よりも鮮明に染色可能であること[66]から、PLAG4 ドメインが有用な標的であることを示唆している。第一章の考察に記載したが、PLAG4 ドメインはプロリンを含み立体構造がタイトである。この安定した構造の維持が抗体の抗原認識能の向上に寄与しているかもしれない。これに加え、本章で示した低分子 Aggrus の存在は、抗体の標的が増えることを意味し、感度の向上に寄与するだろう。

抗体のオフターゲット検索では vWF に着目した。これは vWF が血中に存在すること、及びコラーゲン・血小板と相互作用して止血の役割を果たすためである。WB では PG4D2 抗体が SDS により伸長された状態の vWF を認識できることを確認した。PG4D2 抗体の認識する vWF の"RIEDL"配列だが、これは vWF の A3 ドメイン[67]に存在する。A3 ドメインは vWF とコラーゲンの結合に関連するドメインである。A3 ドメインと類似した立体構造を持ち、血小板と結合する vWF の A1 ドメインは、せん断応力が弱い状況下では血小板と結合するものの、すぐに離れてしまい、凝集塊の形成を誘導しない[68]との報告がある。A1 ドメインが血小板と結合できることから、A1 ドメインがタンパク質の外側に露出していることが伺える。A3 ドメインも A1 ドメインのように露出している可能性は高い。しかし、vWF は最大 10,000 kDa もの大きさのマルチマーを形成するため[68]、A3 ドメインが露出しているてもどの程度"RIEDL"領域が液面に露出しているかは定かではない。この検証の為、ヒ

ト血漿を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、生理条件下の vWF に PG4D2 抗体がほとんど結合しないことを示した。これは実際に患者さんに PG4D2 抗体を投与しても血中で vWF にほとんど結合しないことを示しており、PG4D2 抗体が生体内で Aggrus-CLEC-2 結合阻害活性を発揮しうることを示唆している。vWF への PG4D2 抗体の結合能に関連して、vWF の A2 ドメインは ADAMTS13 によって切断されることが知られている[69]。この切断は vWF がせん断応力に晒されているときに起こると報告されている。RIEDL 配列は A2 ドメインの隣の A3 ドメインに存在し、ADAMTS13 の切断によって A3 ドメインが液面に暴露される可能性がある。また、せん断応力下では vWF の立体構造が変化することが示されており、この際に vWF の RIEDL 配列への立体障害が減る可能性も考えられる。A3 ドメインにおける”RIEDL”配列の位置であるが、A3 ドメインとコラーゲンの共結晶[70]で RIEDL 配列をマッピングすると、コラーゲン結合部位と反対側に位置することが分かった。また A3 ドメインと vWF-コラーゲン結合中和抗体の共結晶[71]では、中和抗体が vWF のコラーゲン結合部位に結合していた。この事実は、PG4D1 抗体/PG4D2 抗体が vWF-コラーゲン結合を阻害しないことを示唆している。

また vWF の”RIEDL”配列を調べていた際に、興味深いことに気がついた。vWF は RIEDL に加えて更に 2 文字後方まで Aggrus と相同な配列を有していることが分かった。つまり、”RIEDLPT”を vWF が有しており、PLAG4 ドメインと同じ配列”EDLPT”が vWF に存在することが分かった。これは CLEC-2 と vWF がこの部位で結合する可能性を示唆している。未だ報告は無いが、A1 ドメインのように、A3 ドメインが CLEC-2 を介して、結合/解離を繰り返しているかもしれない。

PG4D1 抗体/PG4D2 抗体で WB することで新たに検出された 31 kDa のバンドであるが、先の LpMab-7 抗体も認識する[65]こと、また C 末端に Flag タグを付けた Aggrus 発現ベクターを用いて Aggrus を発現させ、Flag 抗体で IP してもバンドが見られる(データ示さず)ことから Aggrus タンパク質であることは確かだと考えられる。開始メチオニンの違いについても検討したが、そもそも M43 からタンパク質配列が始まるのであれば、PLAG3 ドメインは削られていないことから、P2-0 抗体や MS-1 抗体で検出が可能だと考えられるが、Fig. 0-3B、Fig. 2-7B, C で示したように 31 kDa にこのバンドは検出されていない。Fig. 2-7B において、PLAG ドメイン欠損変異 Aggrus 発現株に対して WB を行っているが、38 kDa や 25 kDa のバンドは欠損に伴い、バンドがシフトダウンするのに対して、31 kDa のバンドはこのシフトダウンが起こっていない。すなわち、Aggrus の 29-34 a.a. (PLAG1 ドメイン)や 47-52 a.a. (PLAG3 ドメイン)が含まれていないと考えられる。他グループの作製した LpMab-2 抗体は

Aggrus の糖鎖とアミノ酸を認識する抗体で、55-64 a.a.を認識する[58]。この抗体を WB に用いた際には 31 kDa のバンドは認識されない。一方で LpMab-3 抗体[58]も Aggrus の糖鎖とアミノ酸を認識する抗体で、76-81a.a.を認識する。この抗体を WB に用いた際には 31 kDa のバンドを認識できる。また、WB で 3 本確認できるバンドのうち 25 kDa のものは糖鎖修飾がなされていない Aggrus であると言われている[58]。この 25 kDa のバンドが 38 kDa のバンドと対応するのであれば、31 kDa の Aggrus に対応する糖鎖修飾されていない小さな Aggrus のバンドがあるべきと考えられるが、これは確認できない。以上のことより、全長の Aggrus タンパク質にまず糖鎖修飾がなされ、次に N 末側の 55-75 a.a.のどこかで切断が起こることにより 31 kDa の Aggrus が形成されると考えられる。また Aggrus はその分子量の半分以上が糖鎖であるとも言われ[43]、Aggrus を内在性に発現している細胞株を WB すると、高い分子量の Aggrus を発現する細胞や、バンドがブロードになる細胞が確認される。このことを考慮に入れると、31 kDa の Aggrus と 38 kDa の Aggrus が異なる糖鎖修飾を有している可能性も否定はできない。

細胞表面のタンパク質をビオチン化し、PG4D2 抗体で免疫沈降の後、HRP-Avidin で検出できたことは、31 kDa のバンドの Aggrus も細胞表面に発現していることを示している。これは PLAG4 ドメインが量的に PLAG3 ドメインよりも多く細胞膜に発現している可能性を示唆しており、PLAG3 ドメインと PLAG4 ドメインの CLEC-2 に対する結合強度の違いを説明する理由の 1 つになるかもしれない。

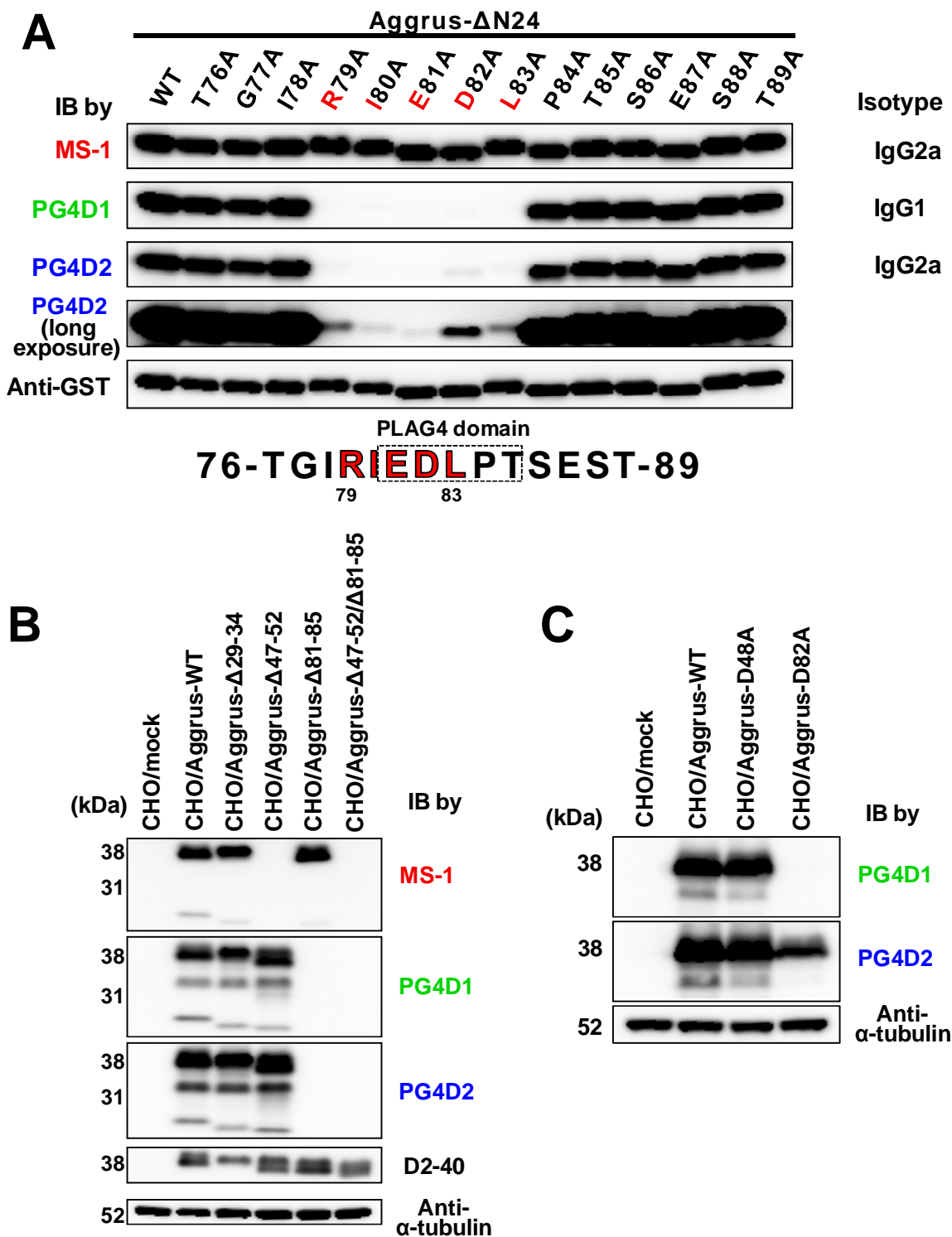


Fig. 2-7 PG4D1抗体、PG4D2抗体を用いたWB

A. アラニンスキャン法にてPG4D1抗体、PG4D2抗体のエピトープを決定した。ローディングコントロールにはGSTを用いた。B. PLAGドメイン欠損変異細胞を用いてWBを行った。C. PLAGドメイン点変異細胞を用いてWBを行った。

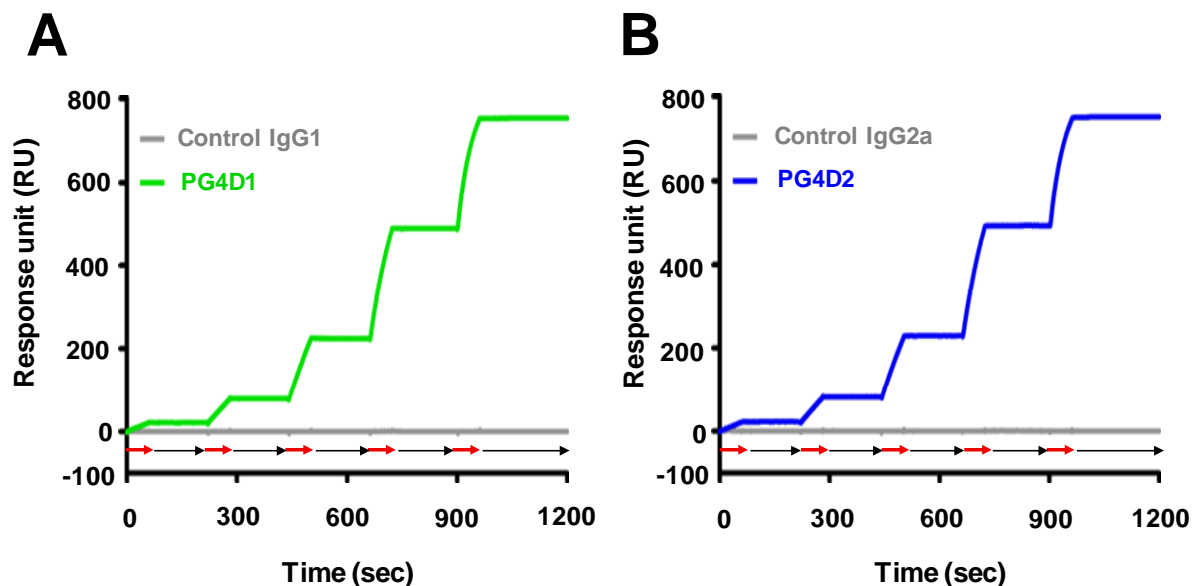


Fig. 2-8 SPR法によるPG4D1抗体、PG4D2抗体の解離定数の決定

A. リコンビナントAggrusを固定化したチップにマウスControlIgG1抗体およびPG4D1抗体を流し、SPRの測定を行った。赤矢印の時間において抗体をチップ上に流した(5濃度: 3.7, 11.1, 33.3, 100, 300 nM)。黒矢印の時間においてはバッファーのみを流した。B. リコンビナントAggrusを固定化したチップにマウスControlIgG2a抗体およびPG4D2抗体を流し、SPRの測定を行った。

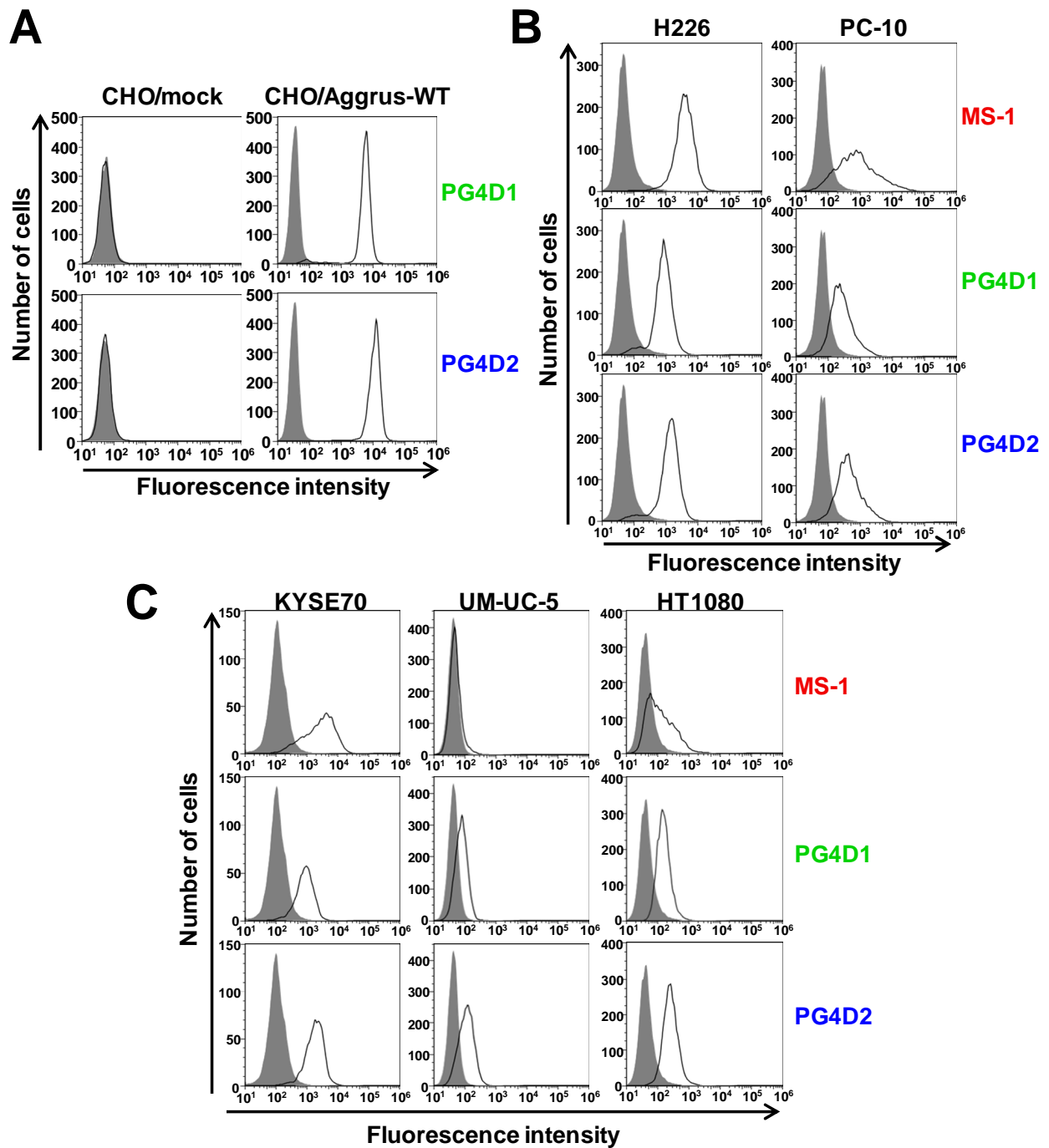


Fig. 2-9 PG4D1抗体、PG4D2抗体による内在性Aggrusの認識

A. CHO/mock細胞およびCHO/Aggrus-WT細胞に対する反応性をFACSで評価した。B. 肺がん細胞株であるH226細胞およびPC-10細胞に対する反応性をFACSで評価した。C. 扁平上皮がんであるKYSE70細胞(食道がん)およびUM-UC-5細胞(膀胱がん)、線維肉腫であるHT1080細胞に対する反応性をFACSで評価した。

Table. 2-2 オフターゲットの検索

抗体のエピトープである”RIEDL”配列をNCBIのProtein BLASTを用いて検索した。生物種はヒトに限り、またプレフィックスがNPで始まるものに限定した。

Symbol	Description	Accession	Localization	
PLCB4	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4 isoform a	NP_000924.3	cytosol	nucleus
	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4 isoform b	NP_877949.2		
	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4 isoform c	NP_001166117.1		
AGAP3	arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 3 isoform a	NP_114152.3	nucleus	cytosol
	arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 3 isoform b	NP_001036000.1		
	arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 3 isoform d	NP_001295233.1		
STAG2	cohesin subunit SA-2 isoform a	NP_001036214.1	nucleus	cytosol
	cohesin subunit SA-2 isoform b	NP_006594.3		
CCDC106	coiled-coil domain-containing protein 106	NP_037433.2	nucleus	cytosol
CKAP5	cytoskeleton-associated protein 5 isoform a	NP_001008938.1	cytosol	cytoskelton
	cytoskeleton-associated protein 5 isoform b	NP_055571.2		
DDO	D-aspartate oxidase isoform a	NP_003640.2	peroxisome	cytosol
	D-aspartate oxidase isoform b	NP_004023.2		
EVPL	envoplakin isoform 1	NP_001307676.1	cytoskelton	extracellular
	envoplakin isoform 2	NP_001979.2		
GCC2	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2	NP_852118.1	golgi apparatus	cytosol
HSBP1	heat shock factor-binding protein 1-like protein 1	NP_001129652.1	nucleus	
HS6ST3	heparan-sulfate 6-O-sulfotransferase 3 precursor	NP_703157.2	extracellular	
JAKMIP3	janus kinase and microtubule-interacting protein 3 isoform a	NP_001310015.1	golgi apparatus	
	janus kinase and microtubule-interacting protein 3 isoform b	NP_001310016.1		
	janus kinase and microtubule-interacting protein 3 isoform c	NP_001310017.1		
	janus kinase and microtubule-interacting protein 3 isoform d	NP_001310018.1		
	janus kinase and microtubule-interacting protein 3 isoform e	NP_001098991.1		
KATANBL1	KATNB1-like protein 1	NP_078989.1	nucleus	
PDPN	podoplanin isoform a	NP_006465.3	plasma membrane	
	podoplanin isoform b	NP_938203.2		
	podoplanin isoform c	NP_001006625.1		
	podoplanin isoform d	NP_001006626.1		
SPEF1	sperm flagellar protein 1	NP_056232.2	cytoskelton	
UBN2	ubiquitin-2	NP_775840.3	extracellular	nucleus
vWF	von Willebrand factor preproprotein	NP_000543.2	endoplasmic reticulum	extracellular

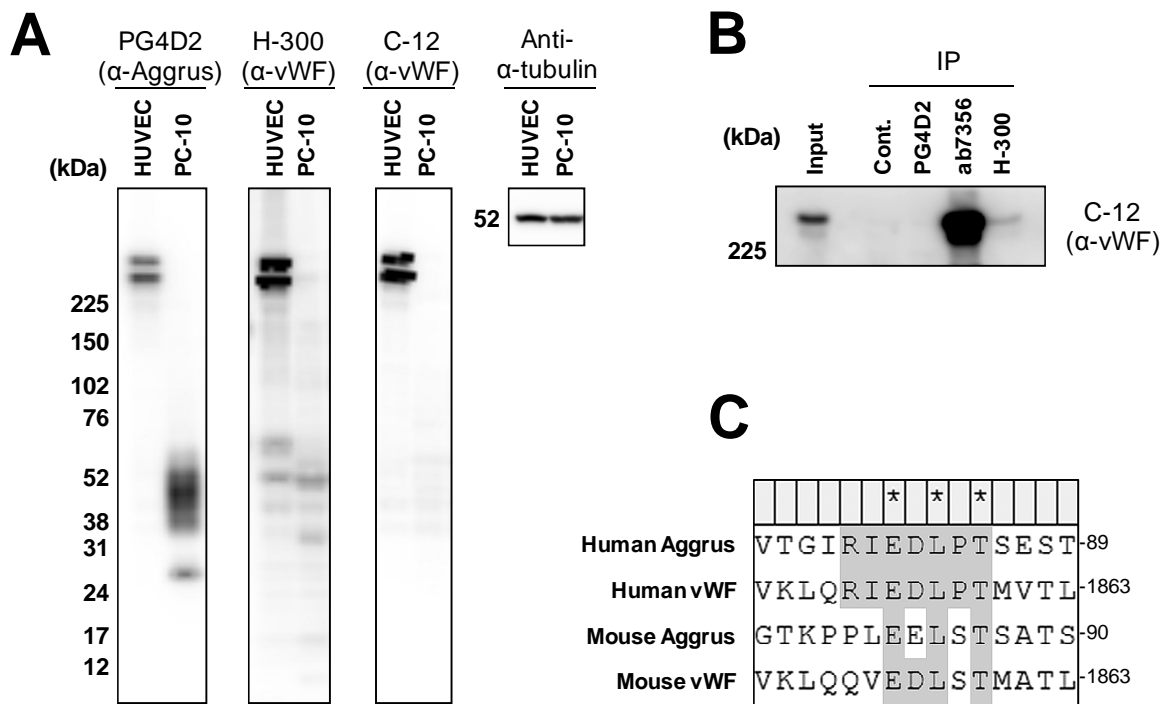


Fig. 2-10 PG4D2抗体のvWFに対する反応性

A. WBにてPG4D2抗体のvWFに対する反応性を評価した。H-300およびC-12はvWFに対する抗体である。225 kDa上の2本のバンドがvWFであり、上のバンドがprecursor、下のバンドがmatureである。B. ヒト血漿を用いて免疫沈降を行った。2 μ gの抗体(control, PG4D2, ab7356 (α -vWF), H-300)を用いて免疫沈降し、検出はC-12抗体(α -vWF)を用いた。C. ヒトとマウスにおけるAggrusとvWFタンパク質配列の”RIEDL”近傍の配列をアラインメントした。

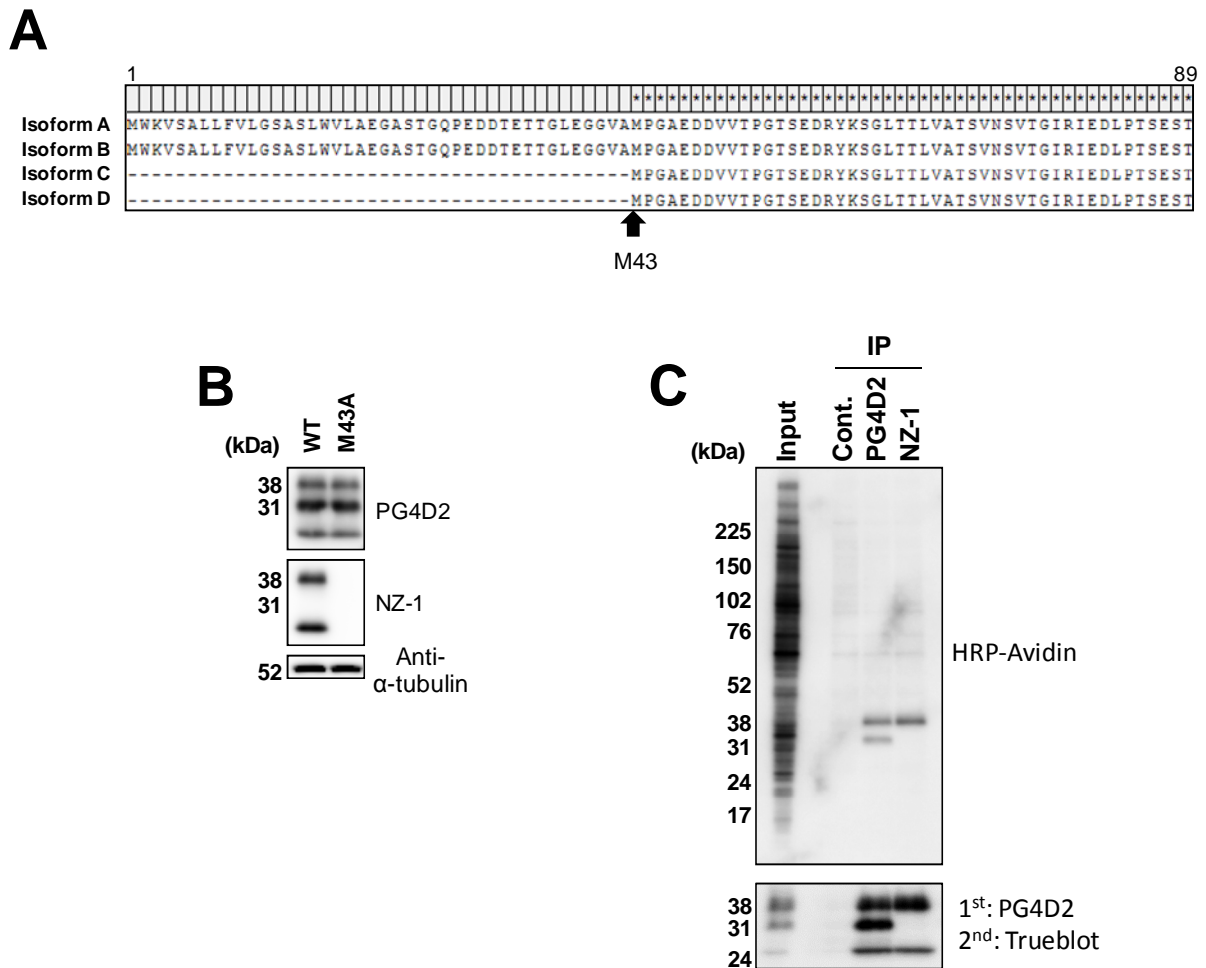


Fig. 2-11 これまで認識されなかった分子量のAggrusに関する解析

A. NCBIに登録されているAggrusアイソフォームのアラインメントを行った。配列は Isoform A (NP_006465.3)、Isoform B (NP_938203.2)、Isoform C (NP_001006625.1)、Isoform D (NP_001006626.1)を用いた。B. CHO細胞にAggrus-WT、Aggrus-M43Aを一過性に発現させ、WBを行った。C. MG63細胞の細胞表面タンパク質をビオチン化し、免疫沈降を行った。WBの検出時にHRP-Avidinまたは1次抗体にPG4D2、2次抗体にTrueblot (mouse)を用いた。

第三章 抗 PLAG4 抗体 PG4D1, PG4D2 の Aggrus-CLEC-2 結合阻害活性の検証

目的

PLAG3 ドメインに対する中和抗体である MS-1 抗体や P2-0 抗体、NZ-1 抗体は *In vitro* において血小板凝集を抑制し、*In vivo* で Aggrus 依存的な実験的肺転移の抑制や、マウス Xenograft モデルにおいて抗腫瘍効果を発揮することが示されてきた[47,49]。これまでの実験結果より、PLAG4 ドメインも PLAG3 ドメインと同じアミノ酸を使い CLEC-2 と結合し、血小板凝集を誘導していることを示してきた。以上より、PLAG4 ドメインに対する抗体である PG4D1 抗体と PG4D2 抗体にも Aggrus-CLEC-2 結合の阻害活性があれば、がん転移の抑制や抗腫瘍効果を発揮できる可能性を示唆している。私は、PG4D1 抗体と PG4D2 抗体 Aggrus-CLEC-2 結合の中和活性について評価を行った。

3-1. *In vitro* における Aggrus-CLEC-2 結合阻害活性の評価

3-1-1. Alphascreen によるリコンビナントタンパク質を用いた評価

作製した抗体が実際に Aggrus-CLEC-2 結合を阻害できることを証明するために、リコンビナント Aggrus とリコンビナント CLEC-2 を用いて alphascreen にて結合阻害実験を行った。この結果、PG4D1 抗体と PG4D2 抗体は、MS-1 抗体と同様に濃度依存的に Aggrus-CLEC-2 結合を阻害できることが分かった(Fig. 3-1A)。更に、抗体濃度が高濃度域において MS-1 抗体よりも強力に結合阻害効果を発揮することを確認した。

3-1-2. FACS 法による CLEC-2 結合の阻害

CHO/Aggrus-WT 細胞株とリコンビナント CLEC-2 の結合阻害実験を FACS にて行った。結果、抗体は細胞膜に発現した Aggrus に結合し、PLAG4 ドメインをマスクすることで、CLEC-2 結合量を減弱させられることが分かった(Fig. 3-1B)。CHO/Aggrus-D48A 細胞株を用いて同様の実験を行うと、PG4D1/PG4D2 抗体の単剤の添加によって、濃度依存的に、また高濃度では、ほぼ完全に CLEC-2 との結合を阻害できることを明らかにした(Fig. 3-1C)。

3-1-3. 血小板凝集の抗体による阻害

血小板凝集の抗体による阻害実験を行った。CHO/Aggrus-WT 細胞株と MS-1 抗体、PG4D1 抗体、PG4D2 抗体それぞれを 30 分間氷上でインキュベートし、血小板凝集実験に用いた。結果、血小板凝集自体は起こってしまうものの、PG4D1 抗体と PG4D2 抗体は MS-1 抗体よりも大幅に血小板凝集を遅延させることができた(Fig. 3-2A)。また、PG4D2 抗体と MS-1 抗

体と併用することによって血小板凝集がほぼ完全に抑制できることを確かめた(Fig. 3-2B)。FACS での CLEC-2 結合アッセイと同様に CHO/Aggrus-D48A 細胞株を用いて、血小板凝集実験を行ったところ、MS-1 抗体と反応させても血小板凝集を抑制することは出来ないが、PG4D2 抗体を反応させることによって血小板凝集をほぼ完全に抑えることが出来た(Fig. 3-2C)。同様に CHO/Aggrus-D82A 細胞株を用いて、血小板凝集実験を行ったところ、PG4D2 抗体と反応させても血小板凝集を抑制することは出来ないが、MS-1 抗体を反応させることによって血小板凝集をほぼ完全に抑えることが出来た(Fig. 3-2D)。

3-1-4. MS-1 抗体と PG4D2 抗体の併用による競合阻害の検証

MS-1 抗体と PG4D2 抗体はそれぞれ、PLAG3 ドメインと PLAG4 ドメインをエピトープとしているが、PLAG ドメインの位置関係や Aggrus タンパク質の立体構造などが原因で、2 抗体の利用時に、互いに競合/非競合的に阻害する可能性がある。抗体の併用に際し、阻害効果が見られるかを明らかにすべく実験を行った。

MS-1 抗体と PG4D2 抗体のそれぞれを DyLight594 でラベリングした。ラベリングした抗体を用いて CHO/Aggrus-WT 細胞の Aggrus を認識させ、FACS で検出するのだが、この際に非標識の MS-1 抗体または PG4D2 抗体を添加する。同じ種類の抗体同士であれば競合阻害が見られると推測でき、別々の種類の抗体であれば併用に際する阻害効果が評価できると考えられる。以上より、標識/非標識の抗体を混合して実験を行った。その結果、標識抗体と、同じ種類の非標識抗体(DyLight-594-MS-1 + MS-1 または DyLight-594-PG4D2 + PG4D2)を添加した場合は、予想通りに競合阻害が起き、非標識抗体の濃度依存的に DyLight594 のシグナル強度が低下した。次に標識抗体と、別の種類の非標識抗体(DyLight-594-MS-1 + PG4D2 または DyLight-594-PG4D2 + MS-1)を添加して実験を行ったところ、阻害効果は確認されなかった(Fig. 3-3)。

考察

In vitro において PG4D1 抗体および PG4D2 抗体の中和活性をリコンビナントタンパク質間の結合阻害、FACS での結合阻害、血小板凝集の抑制能で確認し、そのいずれにおいても PG4D1/PG4D2 抗体が Aggrus-CLEC-2 結合抑制活性を発揮することを示した。さらに、MS-1 抗体よりも強力な阻害活性を有していることを示した。

MS-1 抗体と PG4D1/PG4D2 抗体の阻害活性の差は、(1)標的となるエピトープの違い、(2)抗体の性質の違い、(3)抗原と抗体・CLEC-2 との反応方法、の 3 点によると考えられる。(1)

について、第一章の結果より、PLAG4 ドメインは PLAG3 ドメインよりも強力に CLEC-2 と結合していることを示した。両ドメインの CLEC-2 に対する親和性の違いが、より強力な阻害活性の発揮につながったと考えられる。(2)について、PG4D1 抗体と PG4D2 抗体は非常に似た性質を持っていることを示してきた。CLEC-2 との結合に重要と考えられる E81 と D82 を含むエピトープを認識し、結合速度定数は低い(結合しにくい)ものの、解離速度定数が測定機の検出限界を下回るほどに低い(ほぼ解離しない)ことによって、低い解離定数(0.33 nM 以下)を有している。これにより PG4D1/PG4D2 抗体は Aggrus-CLEC-2 結合を不可逆的に阻害できる。一方で MS-1 抗体は PLAG3 ドメインの CLEC-2 との結合に重要な D48 は認識するものの、E47 は認識しない。また、非常に高い結合速度定数と高い解離速度定数を有する抗体で、解離定数は 9.0 nM である[47]。MS-1 抗体は素早く Aggrus に結合できるものの、解離してしまうため Aggrus-CLEC-2 結合を可逆的にしか阻害できない。これらエピトープの違いと、間逆な抗体の性質によって Aggrus-CLEC-2 結合阻害活性に差が出たものと考えられる。(3)について、*In vitro* の実験系では Aggrus と抗体を先にインキュベーションした後 CLEC-2・血小板と反応させるという順序で実験を行っている。PG4D1/PG4D2 抗体が PLAG4 ドメインに結合するための時間が十分に確保できるため、欠点である結合速度定数の低さがカバーされていると思われる。これが MS-1 抗体との阻害活性の差を大きくしている一因と考えている。PG4D1 抗体・PG4D2 抗体と同一のエピトープを持つ LpMab-7 抗体には中和活性が無いことが報告されている[72]。中和活性の有無や PG4D1 抗体・PG4D2 抗体のはがれにくいという特性は、LpMab-7 抗体と差別化できる大きな要素であろう。

抗体の併用実験や PLAG3/4 ドメインのいずれかの機能欠損変異株を用いた抗体での阻害実験の結果から、PLAG3 ドメインと PLAG4 ドメインの両方を阻害することで Aggrus と CLEC-2 の結合を完全に抑制できることを示した。MS-1 抗体と PG4D2 抗体を併用しても競合/非競合的な阻害が起こらないことを確認したので、MS-1 抗体と PG4D2 抗体の併用は有望な Aggrus-CLEC-2 結合の阻害方法であると考えられる。但し、1 分子の Aggrus に対して、MS-1 抗体と PG4D2 抗体が結合できるかについては定かではない。これに関しては、データは示していないが、SPR の実験時にチップ上に固定化した Aggrus に PG4D1 抗体を飽和するまで反応させた上で MS-1 抗体を反応させるという実験で検証を試みたことがある。結果は、若干の解離定数の低下はあったものの、MS-1 抗体は Aggrus に結合し、ほぼ PG4D1 抗体を反応させていない時と同様のセンサーグラムを描き出した($K_D = 11$ nM)。併用実験の結果も踏まえて、MS-1 抗体と PG4D2 抗体が互いを邪魔することなく 1 分子に結合できると考えている。

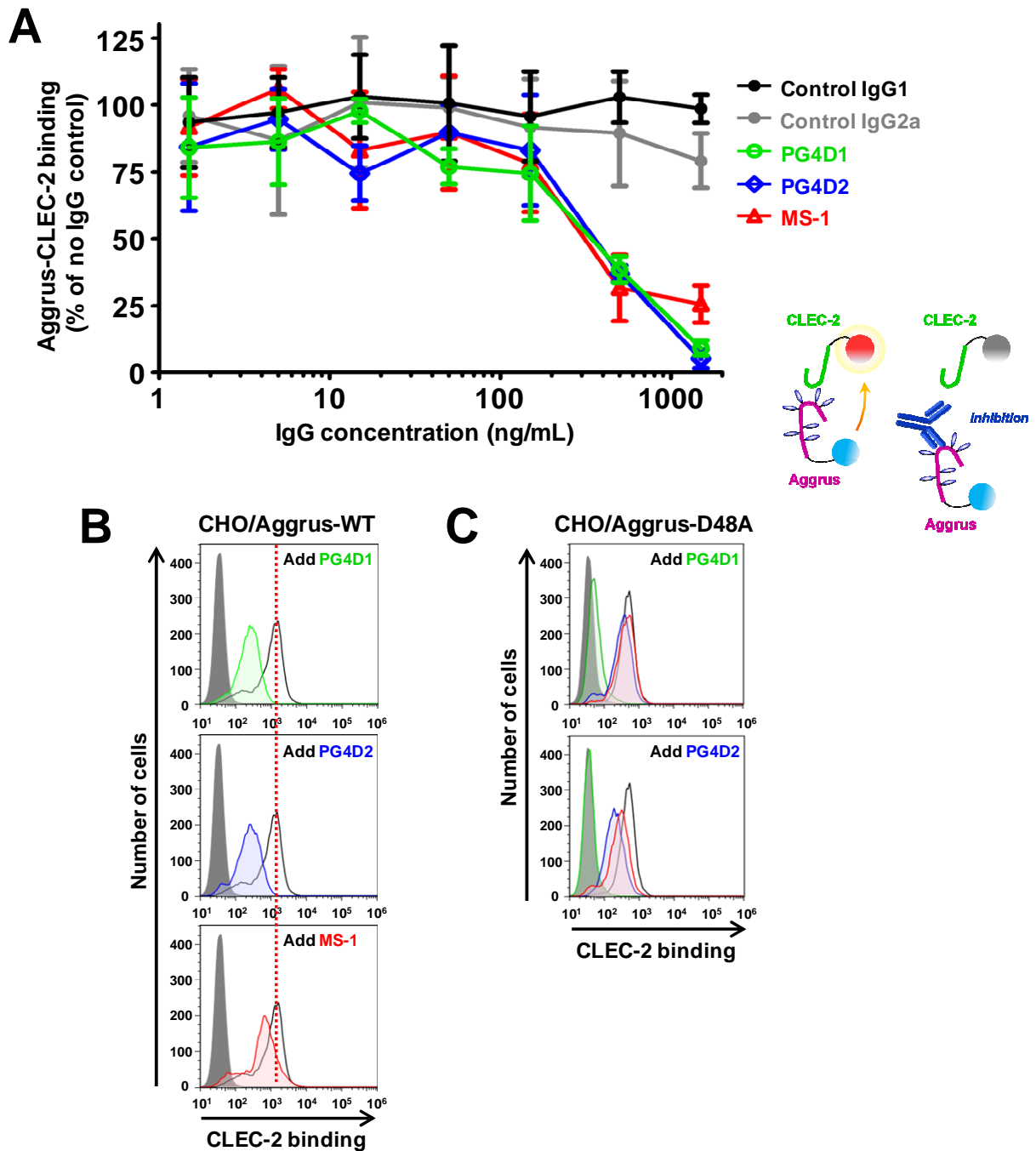


Fig. 3-1 PG4D1抗体とPG4D2抗体のAggrus-CLEC-2結合阻害活性の評価

A. リコンビナントAggrusとリコンビナントCLEC-2を用いてAlphascreenにて結合阻害実験を行った(黒: Control IgG1、灰: Control IgG2a、緑: PG4D1、青: PG4D2、赤: MS-1)。
 B. CHO/Aggrus-WT細胞とリコンビナントCLEC-2結合の阻害をFACSで評価した。抗体はそれぞれ10 μ g/mL加えた。
 C. CHO/Aggrus-D48A細胞とリコンビナントCLEC-2結合の阻害をFACSで評価した。抗体濃度は100 μ g/mL (green area)、10 μ g/mL (blue area)、1 μ g/mL (red area)、0 μ g/mL (open area)加えた。

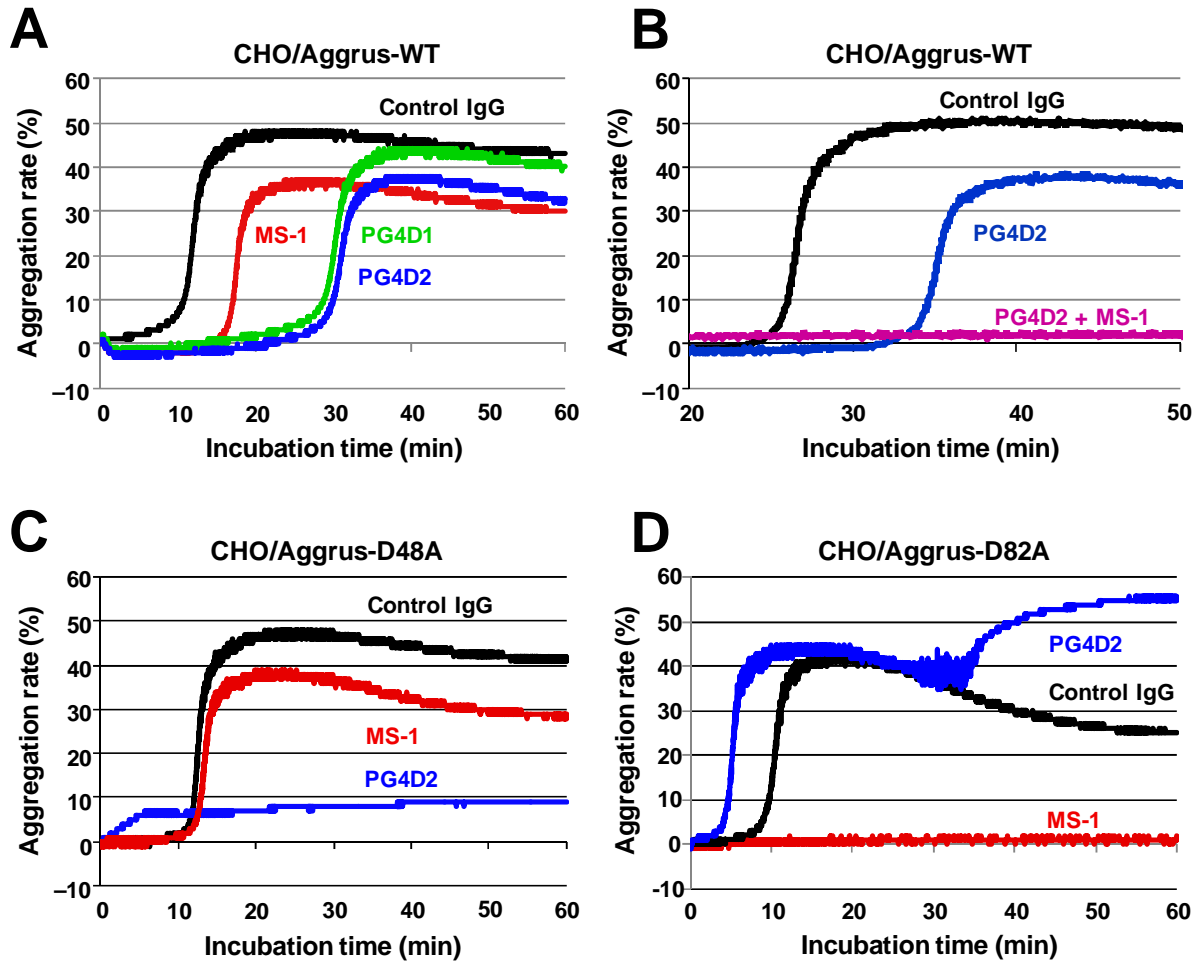


Fig. 3-2 PG4D1抗体とPG4D2抗体は血小板凝集を阻害する

- A. CHO/Aggrus-WT細胞と各抗体10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をon iceで30分間反応させ、血小板凝集に用いた。
- B. CHO/Aggrus-WT細胞とマウスControl抗体、PG4D2抗体を10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、PG4D2抗体とMS-1抗体を混合したもの(5 + 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)をon iceで30分間反応させ、血小板凝集に用いた。
- C. CHO/Aggrus-D48A細胞と各抗体10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をon iceで30分間反応させ、血小板凝集に用いた。
- D. CHO/Aggrus-D82A細胞と各抗体10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をon iceで30分間反応させ、血小板凝集に用いた。

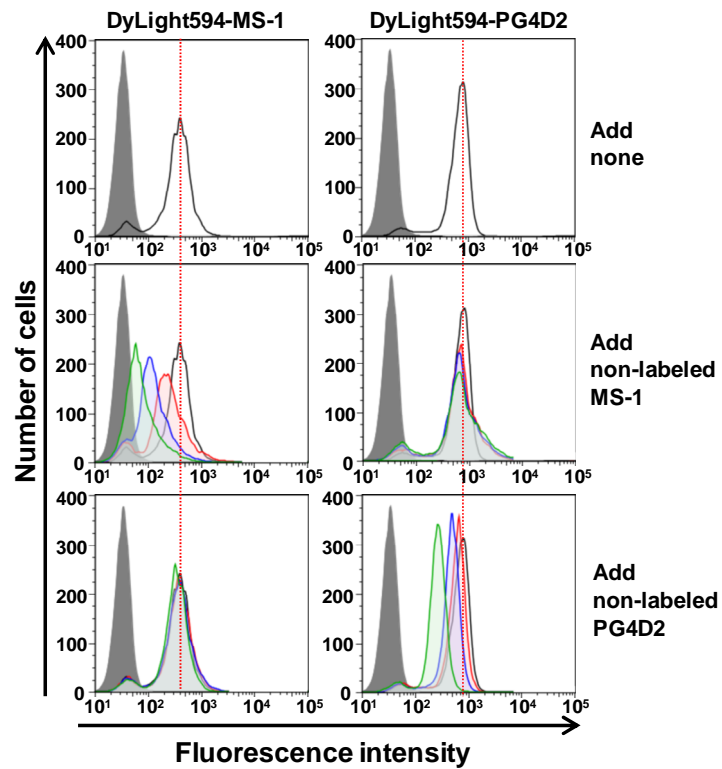


Fig. 3-3 PG4D2抗体とMS-1抗体は競合阻害しない
 PG4D2抗体とMS-1抗体をDylight594でラベリングし、CHO/Aggrus-WT細胞と反応させた。この際に非標識のPG4D2抗体とMS-1抗体も同時に添加し、抗体の競合阻害を評価した。添加した非標識の抗体濃度は10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (green area)、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (blue area)、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (red area)、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (open area)である。

3-2. *In vivo* における Aggrus-CLEC-2 結合阻害活性の評価

3-2-1. PG4D1/PG4D2 抗体は Aggrus 依存的な実験的肺転移を抑制する

PG4D1/PG4D2 抗体の転移抑制能を CHO/Aggrus-WT 細胞株を用いた実験的肺転移にて評価した。抗体の投与は細胞の移植前日に限定することによって、抗体による抗腫瘍効果ではなく、抗体ががん細胞の Aggrus に結合し、血小板凝集を抑制することで肺転移が減少することを評価するアッセイ系である。CHO/Aggrus-WT 細胞の移植前日に BALB/c-*nu/nu* マウスの尾静脈よりコントロール抗体(IgG1 および IgG2a)、PG4D1 抗体、PG4D2 抗体、MS-1 抗体を 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の濃度で投与した。その 24 時間後に CHO/Aggrus-WT 細胞を尾静脈より 2.5×10^5 cells/mouse 移植した。19 日後に肺を取り出し、染色後、肺表面の転移結節数をカウントした。結果、コントロール抗体投与群では、転移結節が 100 個程度確認出来るのに対して、PG4D1/PG4D2/MS-1 抗体投与群はほとんど結節が見られなかった。PG4D1 抗体と PG4D2 抗体は MS-1 抗体と同様に、ほぼ完全に Aggrus 依存的な実験的肺転移を抑制できることを示した(Fig. 3-4)。

3-2-2. 低濃度の抗体による実験的肺転移の阻害効果の検証

先の実験では抗体を 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で投与することで肺転移を抑制できることを示したが、MS-1 抗体と PG4D2 抗体の *In vivo* における抑制効果を比較することはできなかったため、より抗体濃度を下げて実験を行った。併せて *In vitro* において MS-1 抗体と PG4D2 抗体の併用が有効であるという結果を得たため、これについて *In vivo* で検証を行った。

抗体濃度を 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 、0.01 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ と振り、肺転移の抑制能を評価した。抗体の併用では、総投与量が 0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 、0.01 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ となるように MS-1 抗体と PG4D2 抗体を 1:1 で混合した。その結果、1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量では MS-1 抗体、PG4D2 抗体共に、ほぼ完全に Aggrus 依存的な肺転移を抑制することが出来た。0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量では、MS-1 抗体、PG4D2 抗体共に肺転移を完全に抑え切るには至らなかった。0.01 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量では、肺転移は抑制されているが、0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量群よりも転移結節数が増えた (Fig. 3-5)。

MS-1 抗体投与群、PG4D2 抗体投与群、抗体併用投与群(Combo)について比較すると、0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量においても、0.01 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量においても、群間で大きな差は見られなかったが、PG4D2 抗体は MS-1 抗体よりも濃度低下に従って、転移結節数が増加する傾向にあった。また抗体の併用投与は Additive な効果は見られるものの、Synergistic な効果は見られなかった。

3-2-3. 臨床検体を用いた肺転移の抑制実験

Aggrus を発現している臨床検体由来のがん細胞においても PG4D2 抗体が実験的肺転移を抑制できるかを評価した。C.B-17 SCID マウスの尾静脈に 30 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ でコントロールマウス IgG2a 抗体、または PG4D2 抗体を投与した。24 時間後に、当研究室で樹立した臨床検体由来の肺扁平上皮がん細胞である LC-SCC-015 細胞を尾静脈から移植した。31 日後にマウスから肺を取り出し、染色後、肺表面の転移結節数をカウントした。その結果、PG4D2 抗体投与群はコントロール抗体投与群に比べ、大幅に肺転移結節を減少させた(Fig. 3-6)。

3-2-4. PG4D2 抗体は PC-10 細胞のマウス Xenograft モデルにおいて抗腫瘍効果を発揮する

先行研究において、ヒトキメラ MS-1 抗体は Aggrus 陽性肺扁平上皮がん細胞 PC-10 のマウス Xenograft に対して抗腫瘍効果を発揮することが確かめられている。PC-10 細胞のマウス Xenograft には多くのマウス由来の血小板が浸潤しており、腫瘍との相互作用によって活性化した血小板から放出される増殖因子やサイトカインが腫瘍の増殖を助長している[47]。キメラ MS-1 抗体の投与によって腫瘍に発現した Aggrus と血小板の相互作用を抑制し、血小板凝集を抑え、血小板からの増殖因子やサイトカインの放出を抑制することで抗腫瘍効果を発揮している。この抗腫瘍効果が PG4D2 抗体でも発揮されるかを検証すべく、PC-10 細胞のマウス Xenograft モデルを用いた腫瘍の治療実験を行った。

はじめに PG4D2 抗体/MS-1 抗体が、PC-10 細胞の誘導する血小板凝集を阻害できるかについて *In vitro* で評価した。結果、血小板凝集そのものは起こってしまうものの、両抗体共に血小板凝集を遅延させられることを確認した(Fig. 3-7A)。

次に PG4D2 抗体/MS-1 抗体が *In vitro* で PC-10 細胞の増殖に影響を与えるかについて細胞増殖アッセイで評価した。結果、*In vitro* においては PG4D2 抗体、MS-1 抗体共に PC-10 細胞の増殖に影響しないことを確かめた(Fig. 3-7B)。

最後に PC-10 細胞のマウス Xenograft 治療実験を行った。PG4D2 抗体、MS-1 抗体のアイソタイプは共に IgG2a であり、ADCC 活性、また CDC 活性を有するアイソタイプである。今回は、ADCC 活性、CDC 活性の効果を除外すべく、T 細胞・B 細胞が欠損しており、補体の活性がなく、NK 細胞の活性も低下しており、ADCC 活性、CDC 活性が望めない免疫不全マウスである NOD/SCID マウスを用いて実験を行った。初めに NOD/SCID マウスに PC-10 細胞を皮下移植し、腫瘍体積が 80mm^3 になった時点から抗体の投与を始め、治療を開始した。抗体は 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 、週 2 回マウス尾静脈から投与した。

その結果、PG4D2 抗体投与群は、コントロール抗体投与群に比べて有意に腫瘍の増殖を

抑制した(Fig. 3-7C)。PG4D2 抗体が発揮した抗腫瘍効果は MS-1 抗体とほぼ同等であった。実験的肺転移と同様に総投与量が等しくなるように PG4D2 抗体と MS-1 抗体を 1:1 で混合して併用投与を行ったが、治療成績は PG4D2 抗体と MS-1 抗体の単剤投与群と同等で、Synergistic な効果は見られなかった。

考察

PG4D1 抗体と PG4D2 抗体の転移抑制効果を確認することが出来た。そして、PLAG4 ドメインも肺転移の誘導に関与していることを示した。抗体投与量を下げた実験的肺転移では MS-1 抗体と PG4D2 抗体が同程度のがん転移抑制効果を示した。

これに関して、*In vitro* の結果では PG4D2 抗体による阻害効果の方が強かった為、阻害効果は *In vivo/In vitro* で相関しなかった。また *In vitro* では、単剤では CLEC-2 結合、血小板凝集を抑制しきれなかったが、*In vivo* においては、単剤の投与で転移をほぼ完全に抑制できた。これらには(1)抗体と細胞の反応のさせ方の違い、(2)実験的肺転移と *In vitro* 実験系の違い、が影響していると考えている。(1)であるが、前述のように *In vitro* においてはどの実験系においても先に抗体と細胞をインキュベーションして、CLEC-2 や血小板と反応させている。これにより PG4D1/PG4D2 抗体の結合速度定数の小ささがマスクされていると考察した。*In vivo* の実験系では物理的に細胞とのプレインキュベーションの時間が無い。プレインキュベーションした細胞を尾静脈から移植することもできたが、せつかくの *In vivo* 実験であるのに人工的になりすぎてしまうと考えた為、これを避けた。このため、阻害活性の差が *In vitro* のように見られなかったのだろう。先行研究では、P2-0 抗体においてプレインキュベーションした細胞を移植しているが、この方法ではより低濃度の条件で十分な転移抑制効果が見られている[46]。また、PG4D2 抗体の濃度を下げていったときに MS-1 抗体よりも抑制効果が減少してしまうこと(Fig. 3-5)も結合速度定数の小ささに起因しているのだろう。

(2)について、今回用いた実験的肺転移の系は、がん細胞を尾静脈から移植して、肺にトラップされるまでの過程と、肺で生存・増殖する過程の 2 つに分けられると考えている。肺トラップの過程では、がん細胞を尾静脈より移植してから肺にトラップされるまでの時間は非常に短いと考えられる。そのため、抗体の血小板凝集を遅延させる効果(Fig. 3-2A)だけで十分な転移抑制効果につながったと考えられる。MS-1 抗体や、MS-1 抗体の一本鎖抗体 K-11 の投与はがん細胞の尾静脈移植後の肺トラップ数を減少させることが示されている[32,73]。肺にトラップされる細胞が減ったということは、がん細胞が血小板凝集できないことによって腫瘍塊のサイズが小さいまま維持され、物理的に肺の微小血管に詰まらなかつ

たためと推測される。その後、凝集塊を形成できないままに血流によるせん断応力を受け続け、細胞が死滅したと考えられる。次に肺でがん細胞が生存・増殖する過程だが、肺の微小血管にトラップされるとがん細胞はその場に固定されることになり、血流から強いせん断応力を受けることが想像できる。この際のがん細胞が血小板凝集を誘導できれば、せん断応力を回避でき、生存に寄与することは間違いない。この際の Aggrus 依存的な血小板凝集を中和抗体で阻害することが転移巣の形成阻害に寄与しているかもしれない。Aggrus の CD9 による抑制が肺トラップ後の生存を抑制することも示されており[74]、転移初期における中和抗体を用いた Aggrus の抑制が転移巣での生存に影響を与えていることを示唆している。一方で中和抗体の後日投与が実験的肺転移をあまり抑制しないことから、この寄与はあまり大きくないのかもしれない。この実験系では ADCC/CDC 活性の影響が小さいと考えている。抗体の濃度が低いこと、エフェクター活性を有さない PG4D1 抗体や P2-0 抗体でも肺転移を抑制できることが理由である。PG4D1 抗体、PG4D2 抗体の投与においても MS-1 抗体と同様の機序で肺にトラップされる細胞が大幅に減少したことで、肺転移が抑制されたと考えられる。実際に *In vivo* で Aggrus が誘導する血小板凝集が起こるかについては次のような実験を当研究室で行ったことがある。Aggrus 陽性の UM-UC-5 細胞と Aggrus 陰性の A549 細胞をマウスに尾静脈から移植し、直後に心採血、そこから血小板を回収すべく遠心を行うと、A549 細胞移植マウスの血液では血漿画分(PRP)に血小板を目視で確認できるのだが、UM-UC-5 細胞移植マウスの血液ではこれが確認できない。がん細胞と血小板が凝集塊を形成し、沈降してしまったと推測できる。

第二章にて vWF がオフターゲットとして挙げられたが、マウス vWF における当該箇所の配列は”QVEDLST”であり、PG4D1/PG4D2 抗体のエピトープである”RIEDL”は存在しないため、中和活性の評価において、vWF の阻害によって血小板凝集が抑制されたわけではないことを明記しておく。

臨床検体由来のがん細胞を用いて実験的肺転移を行ったが、PG4D2 抗体は肺転移を大幅に抑制することが出来た。この結果から、実際の患者さんにおいても転移を抑制できる可能性を示した。完全に実験的肺転移を抑え切れていないのは、がん細胞そのものが持つ血小板凝集誘導活性によるものと考えている。がん細胞が ADP やトロンボキサン A2などを放出し、血小板凝集を誘導すること[75]、Aggrus 以外の血小板凝集誘導因子として GPIIb α や Necl-5、Sialyl Lewis x /sialyl Lewis a 、Integrin などが報告されており[25]、Aggrus 以外の影響は大いに考えられる。また用いた LC-SCC-015 細胞は CHO 細胞よりも直径が目視で大きいため、肺でトラップされやすい可能性も考えられる。

最後に PG4D2 抗体の抗腫瘍効果を確認した。*In vitro* において抗体は細胞の増殖に全く影響しないものの、*In vivo* では抗腫瘍効果を確認出来ることから、*In vivo* における微小環境ががん細胞の増殖に影響していて、それを抗体で抑制していることを示唆している。PC-10 細胞のマウス Xenograft には無数の血小板が浸潤していることが知られている[47]。PG4D2 抗体が PC-10 細胞の血小板凝集を抑制できることから、腫瘍における血小板凝集を PG4D2 抗体が抑制し、腫瘍の増殖を抑えたのだろう。先行研究では *In vitro* において骨肉腫細胞と血小板が凝集塊を形成した際に、活性化した血小板から PDGF BB が放出され、がん細胞の増殖に働くことを報告している[76]。また他グループの報告では、がんが引き起こす血小板凝集で TGF- β が放出され、これが転移を促進することが報告されている[21]。PC-10 腫瘍においても血小板凝集によって血小板から様々な顆粒が放出され、その中の特定の液性因子が増殖に貢献していると考えられるが、特定はできていない。しかし、血小板の活性化を抑制する、抗体による Aggrus の抑制という方法は、血小板から顆粒の放出そのものを制限できること、腫瘍の増殖だけではなく、がん転移も未然に防げる可能性を示唆している。今回抗体のみの投与では腫瘍の増殖を抑え切ることはできなかった。しかし、腫瘍の微小環境が増殖に有利に働いていることは明白なので、がんを直接叩く化学療法と併せた治療法が有効な治療方法になると考えられる。

In vivo において、MS-1 抗体と PG4D2 抗体の併用効果は実験的肺転移においても、マウス Xenograft の治療実験においても Additive な効果は見られるものの、Synergistic な効果は見られなかった。これは Aggrus-CLEC-2 結合を阻害する際には PLAG3 ドメインまたは、PLAG4 ドメインのどちらかの阻害で十分であることを示唆しており、単剤の利用で十分であることを意味している。実際の治療に応用する上では薬が減らせることになり、安全性という観点からもメリットの多い投与方法だと考えられる。

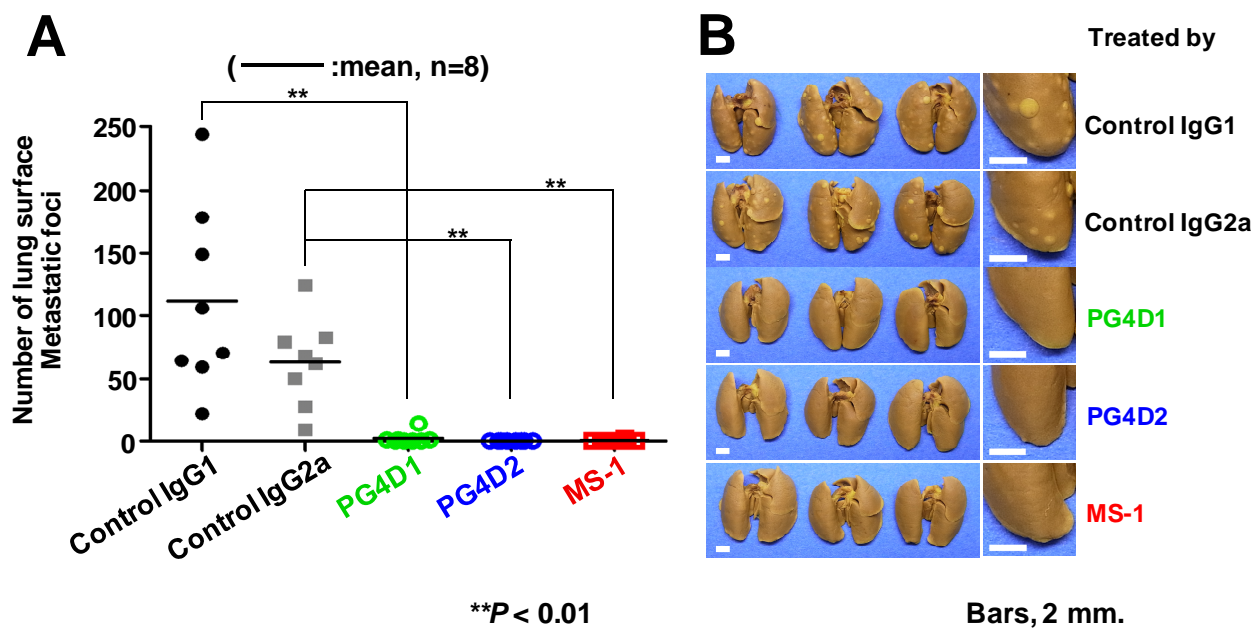


Fig. 3-4 PG4D1抗体とPG4D2抗体は実験的肺転移を阻害する

A and B. BALB/c-*nu/nu*マウスの尾静脈より各抗体を10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 投与した。24時間後、CHO/Aggrus-WT細胞を尾静脈より移植した。19日後、マウスから肺を摘出しピクリン酸で染色し、肺表面の転移結節数をカウントした。スケールバーの長さは2 mm である。統計解析はMann-Whitney U testを実施した。** $P < 0.01$

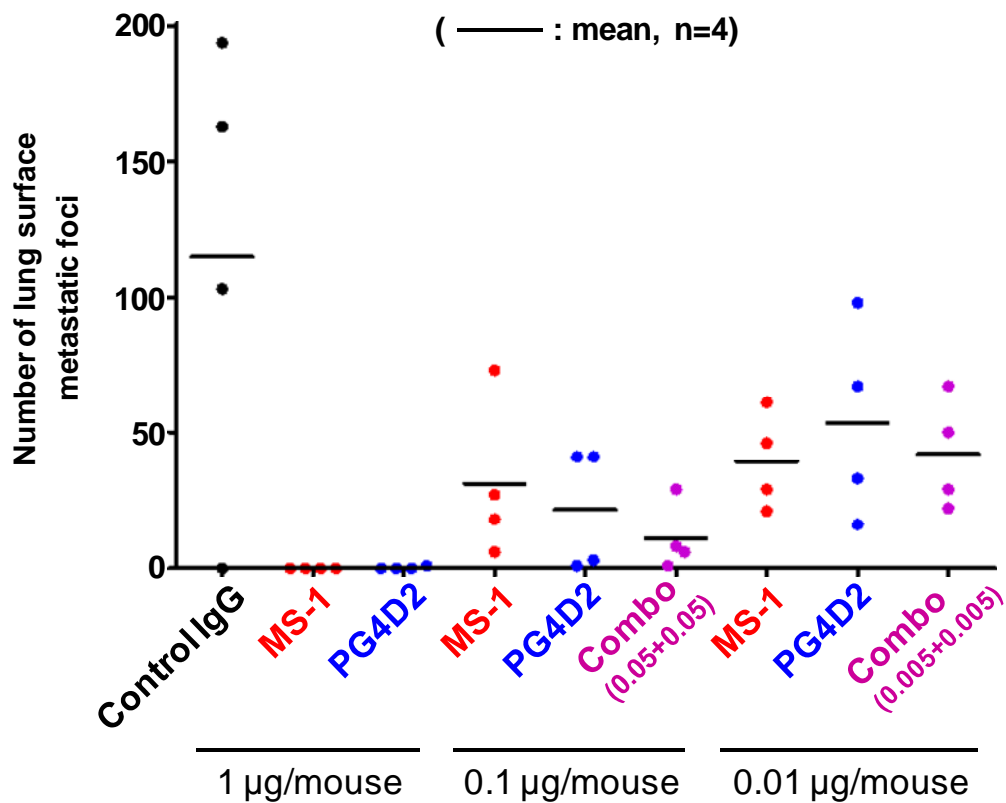


Fig. 3-5 PG4D1抗体とPG4D2抗体は実験的肺転移を阻害する

BALB/c-*nu/nu*マウスの尾静脈より各抗体を1 µg/mouse、0.1 µg/mouse、0.01 µg/mouseの投与量で投与した。24時間後、CHO/Aggrus-WT細胞を尾静脈より移植した。19日後、マウスから肺を摘出しピクリン酸で染色し、肺表面の転移結節数をカウントした。ComboはPG4D2抗体とMS-1抗体の併用を意味する。併用は総投与量が等しくなるようにPG4D2抗体とMS-1抗体を1 : 1で混合した。

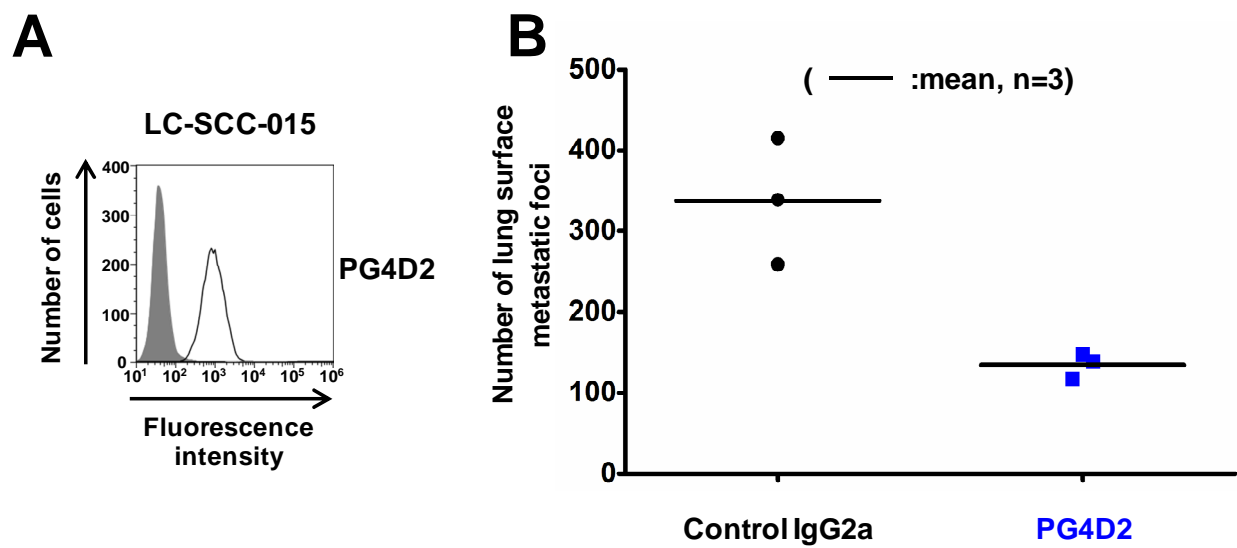


Fig. 3-6 PG4D2抗体はAggrusを内在的に発現する細胞株の実験的肺転移を阻害する
 A. LC-SCC-015細胞に対するPG4D2抗体の反応性をFACSで評価した。B. C.B-17 SCIDマウスの尾静脈から各抗体を30 μ g/mouse投与した。24時間後、LC-SCC-015細胞を尾静脈より移植した。31日後、マウスから肺を摘出しピクリン酸で染色し、肺表面の転移結節数をカウントした。

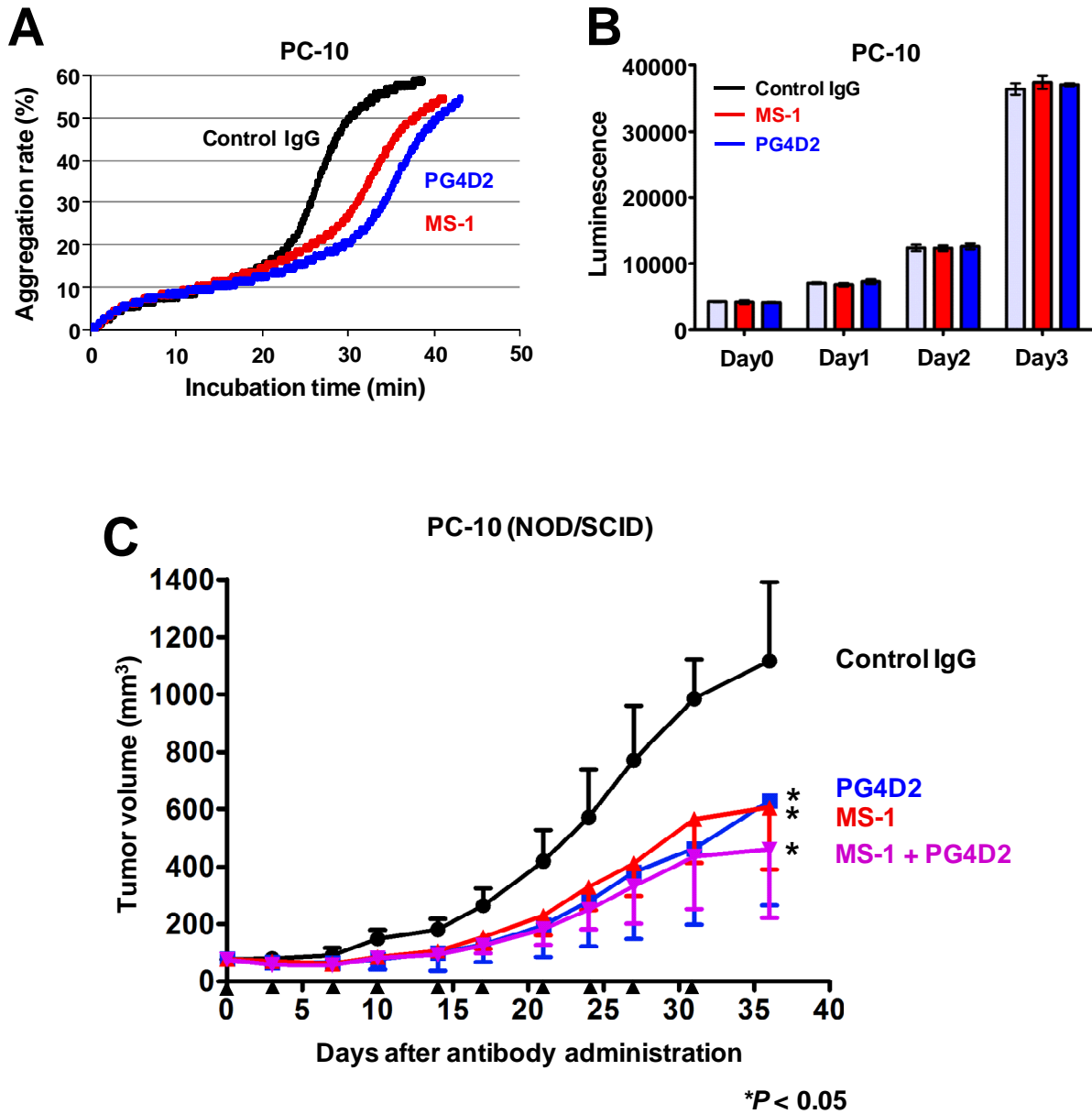


Fig. 3-7 PG4D2抗体はPC-10マウスXenograftに対して抗腫瘍効果を発揮する
 A. PC-10細胞と各抗体を100 µg/mL、on iceで30分間反応させ、血小板凝集実験に用いた。
 B. In vitroにおいて、PC-10細胞の培養液に各抗体を10 µg/mL添加し、3日間の細胞増殖度をCellTiter-Gloを用いて測定した。
 C. NOD/SCIDマウスの皮下にPC-10細胞を移植し、腫瘍体積が80 mm³となったところで抗体による治療を開始した。週2回マウスの尾静脈から抗体を100 µg/mouse投与した。▲は抗体の投与を示す。統計解析は27日目の腫瘍体積で行った。

総括

本研究では、当研究室で同定した Aggrus の機能である血小板凝集の誘導について、まだ理解の浅い血小板上のレセプターである CLEC-2 との結合について、新たな結合部位である PLAG4 ドメインを発見し、PLAG4 ドメインが既知の結合部位である PLAG3 ドメインよりも強力に CLEC-2 と結合していることを明らかにした。また Aggrus が PLAG3 ドメインと PLAG4 ドメインの両方を介して血小板と結合していることを示した。次に私は PLAG4 ドメインに対する中和抗体である PG4D1 抗体と PG4D2 抗体の創製に成功し、これらの抗体が Aggrus を発現するがん細胞の血小板凝集誘導活性、肺転移活性を強力に抑制することを見出した。さらに PG4D2 抗体はマウス Xenograft モデルを用いた薬効評価において、抗腫瘍効果を発揮し、腫瘍の増殖を抑制できることを示した。

私は、「PLAG ドメインの保存性」「新たな CLEC-2 の結合部位」というキーワードから、「新規結合部位も保存されている可能性」「既存の PLAG ドメインと同様の CLEC-2 結合様式を取る可能性」と想像し、PLAG4 ドメインを発見した。2003 年に PLAG ドメインが定義され、ヒト Aggrus の PLAG3 ドメインが血小板凝集に関与すると言われてから、今日まで PLAG4 ドメインが発見されてこなかったのは、作られてきた中和抗体の活性評価によるのではないかと考えている。Aggrus 同定の論文[41]では、マウス Aggrus に対して中和抗体 8F11 が阻害活性を発揮し、血小板凝集を抑えている。また P2-0 抗体や NZ-1 抗体がほぼ完全な実験的肺転移の抑制効果を発揮していることは、ヒト Aggrus の血小板凝集誘導活性は PLAG3 ドメインのみに依存していると考えられるのに足る理由であったと思われる。または PLAG ドメインのコンセンサス配列が”EDxxVTPG”であるが、PLAG4 ドメインは”EDLPT”であり、1 アミノ酸分少ないこと、PLAG3 ドメインの T52 の糖鎖が血小板凝集に重要であるという見解が同定の際になされており、エドマン分解の際に PLAG4 ドメインの T85 に糖鎖修飾が無いと判断されたことから、CLEC-2 結合活性も無いと判断されてしまったのだろう。

T85 に糖鎖が付いているかは定かではない。本研究成果に加え、Aggrus を内在的に発現する細胞株や臨床検体由来の細胞株の PLAG4 ドメインを PG4D2 抗体で阻害することで血小板凝集を抑制できることは確認済みであり、PLAG4 ドメインが CLEC-2 との結合・血小板凝集に関与しているのは間違いない。T85 の重要性はこれまでに示してきた通りであるが、糖鎖付加に関しては、糖鎖が付加していると思われるデータと付加していないと思われるデータが混在している。現在、当研究室で質量分析機を用いて直接 T85 の糖鎖解析を

行っているが、ポジティブな結果はまだ得られていない。CLEC-2 結合活性のためには糖鎖修飾が必要と考えられるのに、その糖鎖修飾が検出できないことは PLAG4 ドメインの奥深さや、研究のしがいを物語っている。今後、糖鎖以外の可能性も考えながら研究が進んでいけばと思っている。また WB で 31 kDa に現れる Aggrus には PLAG4 ドメインが含まれていたが、なぜこのような短鎖 Aggrus が作られるのか、どのような修飾を受けているのかを研究することは、Aggrus を深く理解するための 1 つの鍵になるだろう。

Aggrus が PLAG3 ドメインと PLAG4 ドメインを介して CLEC-2 と結合していることを示したが、Aggrus1 分子に CLEC-2 が 2 分子同時に結合できるかは定かではない。しかし、この 1:2 で結合するモデルは非常に理にかなっていると考えている。なぜならば、CLEC-2 の細胞内領域にある hemi-ITAM ドメインは、その名前の通り 2 つの hemi-ITAM ドメインがそろって下流の Syk シグナルを伝達できるからである。加えて CLEC-2 のシグナルが Dimer を形成することで伝達されるという報告[53,54]も 1:2 結合モデルをフォローしていると考えられる。物理的に結合できるかということに関しては、本研究で MS-1 抗体と PG4D2 抗体が互いに競合することなく Aggrus に結合できることを示したが、抗体は約 150 kDa の分子であり、CLEC-2 は約 35 kDa の分子である。より大きい抗体で競合しないことは、より小さい CLEC-2 で競合しない可能性を示唆している。

一方で、PLAG4 ドメイン発見の冒頭でマルチプルアラインメントを作成したときに生物種特異的な配列は除外して、ヒト配列にマッチするようにアラインしたと記載したが、このとき除外された種特異的な配列の中には PLAG ドメインと思われる配列がいくつか存在していた。既報においても、マウス Aggrus では PLAG1/PLAG3 ドメインの 2 つが機能的であることが示唆されている[42]。これらは暗に Aggrus1 分子と CLEC-2 が 2 分子結合しなくても良いことを示唆している。生物種それぞれの生活環境や進化の選択圧により、Aggrus-CLEC-2 の存在比率が選ばれるのであろう。殊ヒトにおいては、進化の過程で PLAG ドメインは 2 つで十分であるという選択圧が働いた。

作製した PG4D1 抗体、PG4D2 抗体は PLAG4 ドメインに対する強力な結合活性および、Aggrus-CLEC-2 結合阻害活性を有しており、その効果を *In vitro*, *In vivo* で示してきた。私の研究の目標は Aggrus を標的とした抗体医薬品を創り出すことであり、これらの抗体が強力な結合力や結合阻害活性を有していることは抗体医薬として魅力的である。Aggrus はリンパ管内皮細胞や I 型肺胞上皮細胞、また腎臓の糸球体足細胞(ポドサイト)など、正常細胞に発現している[77]。このため抗体の ADCC 活性や CDC 活性があると副作用をきたしかね

ない。本研究において正常細胞に発現する Aggrus に抗体が結合することで影響を及ぼす(副作用)という観点では検証は行っていないが、医薬品を目指す上で、アイソタイプをヒトの IgG4 にすることによってこれらのエフェクター活性がほとんどないヒト化抗体の創製を考えている。検討課題としては、投与対象となる患者さんの選定と抗体の投与時期である。患者さんの選定では、腫瘍に Aggrus が高発現していること、腫瘍への血小板の浸潤が選定条件と想定している。前者に関しては、リキッドバイオプシーによる診断を考えている。Cell free DNA を評価する系などが考えられる。また、Aggrus はテトラスパニンの CD9 分子と共局在することが報告されている[74]ので、テトラスパニンが多く含まれ、がん細胞から放出されるエクソソームに Aggrus が存在する可能性がある。これを ELISA などで検出することができれば、診断に用いることが出来るだろう。生検があるのであれば、Aggrus の検出に関して PLAG4 ドメインは優秀な標的である。PG4D1/PG4D2 抗体を用いて精密な診断が可能だろう。後者に関しては、実際にバイオプシーなどで得た患者生検を免疫染色することが最も正確であると考えられるが、なるべく非侵襲の方法で行いたい。血中の血小板数と腫瘍に浸潤している血小板数は相関する可能性があるので、詳細な検証を行っていきいたい。また、腫瘍特異的に血小板が活性化されたことで放出された液性因子が血中に漏れ出していることも十分に考えられる。マーカーとなる分子を同定し、血液から液性因子を検出する系を考案することは重要と思われる。

投与時期と方法に関して、転移を抑制するという観点においては医薬の投与タイミングは常に議論に上がる問題である。しかし PG4D1/PG4D2 抗体は転移を抑制することのみに焦点を置いていない。原発腫瘍における血小板凝集の抑制を介した抗腫瘍効果も治療標的としている。以上から、原発腫瘍で診断がついた時点での投与が望ましいと考える。これにより、原発巣のがん微小環境への攻撃とがん転移を事前に防ぐことを目的とする。実際にマウスモデルにおいて、MS-1 抗体は原発巣からの自然転移を抑制できることを示している[47]。また、Aggrus-CLEC-2 結合の阻害は生理的な止血に影響を及ぼさないとされており、抗血小板薬などと違い、手術前後での投薬も可能である。術前に投与することで外科的な腫瘍切除の際に発生する播種性転移を抑制できる可能性が高い。すでに存在する転移巣への抗腫瘍効果の発揮に関して、これは原発腫瘍に対する抗腫瘍効果の発揮と同等のメカニズムで発揮されると考えている。転移巣を攻撃するためには抗体が抗腫瘍効果を発揮する血中濃度が必要だと考えている。これに加えて、PG4D2 抗体による抗腫瘍効果が発揮されるためには腫瘍内への血小板の浸潤が必要である。原発巣に血小板が浸潤しているがんでは、転移巣でも血小板が浸潤している可能性は十分に考えられる。一方で転移初期におい

ては血管新生が不十分である可能性が高く、抗体による治療効果は低いと考えられる。しかし、腫瘍が増殖すると血管新生が進み血小板が浸潤してくることが考えられ、この際には PG4D2 抗体が抗腫瘍効果を発揮し、転移巣の増大を抑制できると考えている。PG4D1/PG4D2 抗体は、抗体濃度が高い時に強力な Aggrus-CLEC-2 結合の抑制効果を示している。マウス実験の結果もあわせて、十分な血中濃度を確保し、他の化学療法などと併せて腫瘍を攻撃することが、治療効果を最大限に発揮する投与方法であろう。

PG4D1/PG4D2 抗体は、血小板と腫瘍が作り出す微小環境を標的としている。この微小環境は Aggrus と CLEC-2 の相互作用により生み出されるが、CLEC-2 をターゲットにすることも可能だと考えられる。しかし私は Aggrus を標的にする方がより望ましいと考えている。それは Aggrus ががんが発現しており、CLEC-2 が血小板に発現しているからである。標的の選定に当たっては副作用の観点から、正常細胞よりはがん細胞を選択したいと考えるのは当然である。実際にこれまで抗 CLEC-2 抗体や Aggrus-CLEC-2 結合を標的とした CLEC-2 の低分子阻害剤が創製されてきた[78,79]。マウス CLEC-2 の抗体である INU1 抗体は *In vivo* において、血小板を Depletion してしまうことが示されており、また血小板を産生する巨核球への悪影響についても示唆されている[78]。Aggrus-CLEC-2 結合の CLEC-2 側の結合ポケットに嵌りこみ、その相互作用を阻害する低分子化合物 2CP は、*In vivo* の実験的肺転移抑制実験では、2CP による転移抑制効果は見られるものの、シスプラチンの抑制効果に及ばない。低分子でタンパク質-タンパク質相互作用を阻害することは難しい。対して、Aggrus 側の標的は 2 か所あることが本研究から示されたが、*In vivo* の実験結果から、Aggrus-CLEC-2 結合を阻害する際には PLAG3 ドメインまたは、PLAG4 ドメインのどちらかの阻害で十分に阻害し切れることを示しており、単剤の利用で十分であることを意味する。以上より、Aggrus を標的とすることは安全性や効果の観点からも妥当性が高いと考えられる。

本研究では Aggrus が引き起こす血小板凝集を抑制することにフォーカスして研究を行ったが、新規の転移阻害薬・がんと血小板の相互作用を標的とする薬剤を探す上で、血小板凝集を遅延させることができる低分子や抗体が有効であるか、また作製・スクリーニングすることは可能かについて考えたい。Aggrus による血小板凝集は凝集開始までにラグタイムがあることが知られている。ADP などによる血小板凝集ではこのラグタイムが無く、ラグタイムのある血小板凝集は Aggrus-CLEC-2 結合での活性化に特徴的であると考えられている[37]。以上の事から、Aggrus 依存的ながん転移を抑制する低分子・抗体を取得する際には、このラグタイムを伸ばすことができる(血小板凝集の開始を遅延させることができる)という評価方法は特に有効であると考えられる。Aggrus 依存的でないがんと血小板の凝集

阻害に関しては、血小板凝集ががん転移に貢献しているという報告は複数あるため、凝集を抑える・遅延させる薬剤をスクリーニングすることで有効な薬剤を見いだすことは可能と考えられる。一方で、血小板凝集は腫瘍細胞の増殖をも促進する効果があるので、転移だけでなく腫瘍増殖をも抑制させるためには、血小板凝集を止めることが可能な薬剤のスクリーニングが必要だと考えている。PG4D2 抗体と MS-1 抗体の併用効果は本研究では評価しきれなかったが、この観点においては抗体の併用が効果的であると考えている。

医薬品のオフターゲットに関する研究を前向きに行うことは重要である。オフターゲットの可能性として今回 vWF が挙げられた。vWF に結合したことで生理的な止血の作用が阻害されてしまうのであれば、Aggrus を標的とする意味合いが減ってしまうが、結晶構造解析を参照する限り、コラーゲン結合部位とは逆側にエピトープが位置するため、その可能性は低いと思われる。また vWF に抗体が結合してしまうことで抗体の血中濃度が下がってしまう可能性がある。薬効を確保すべく抗体の濃度を上げる必要があると思われるので、臨床試験においては高濃度での評価を行うべきであろう。In vitro において抗体と vWF の詳細な相互作用解析は今後行っていく必要がある。現在検討段階であるが、当研究室にてヒトの全血および洗浄血小板を用いた血小板凝集実験を行っている。この際に PG4D2 抗体で Aggrus 依存的な血小板凝集を抑制できるかを評価したことがあるが、抗体の利用によって血小板凝集を抑制できることを確認している。

最後に、PG4D1 抗体、PG4D2 抗体は PLAG3 ドメインよりも CLEC-2 との結合能が高い PLAG4 ドメインを不可逆的に阻害できる。そして、血小板と腫瘍の作り出す微小環境を標的としていること、MS-1 抗体の結合することのできないがん細胞にも結合できることから様々ながん腫に適応できる抗体医薬品になりうる。止血の作用を阻害することなく、血小板と腫瘍の相互作用を阻害できる標的としての PLAG4 ドメイン、そして医薬品として PG4D1 抗体、PG4D2 抗体は有望なシーズといえる。

材料と方法

細胞培養

チャイニーズハムスター卵巣細胞株 CHO (ATCC)、ヒト悪性中皮腫細胞株 H226 (ATCC)、ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 (ATCC)、マウスミエローマ細胞 P3U1 (ATCC)は、RPMI1640(和光純薬工業)に 10%非動化 FBS、100 µg/ml カナマイシン硫酸塩(Meiji seika ファルマ)を加え培養した。ヒト肺扁平上皮がん細胞株 PC-10 (Immuno-Biological Laboratories)、ヒト食道扁平上皮がん細胞株 KYSE70 (JCRB 細胞バンク)、ヒト骨肉腫細胞株 MG63 (ATCC) は、DMEM (Low-glucose) (和光純薬工業)に 10%非動化 FBS、100 µg/ml カナマイシン硫酸塩を加え培養した。ヒト膀胱扁平上皮がん細胞株 UM-UC-5 (Health Protection Agency)は EMEM (Sigma-Aldrich)に 10%非動化 FBS、1%非必須アミノ酸(和光純薬工業)、100 µg/ml カナマイシン硫酸塩を加え培養した。CMP-シアル酸輸送体欠損 CHO 細胞 Lec2 (ATCC)は α -MEM (Sigma-Aldrich)に 10%非動化 FBS、2mM L-glutamine、0.04 mg/ml L-proline、100 µg/ml カナマイシン硫酸塩を加え培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC (Lonza)は EGM™ -2MV BulletKit™ Medium (Lonza)を用いて培養した。、臨床検体由来ヒト肺扁平上皮がん細胞株 LC-SCC-015 は、(公財)がん研究会有明病院の IRB (治験倫理審査委員会)から承認を得たプロトコルに基づいて、患者さんから同意を得られた検体を用いて当研究室で樹立した細胞株である。培地は DMEM/F-12 + GlutaMAX (Invitrogen)に 1x STEMPRO hESF SFM (Invitrogen)、1.8% BSA (Invitrogen)、8 ng/ml bFGF (BPS Biosciences)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール、10 µM Y-27632 (LC Laboratories)、Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (Nacalai tesque)を加え、これを用い培養した。

CHO 細胞および Lec2 細胞の Aggrus 一過性/安定発現は 6 well プレートに細胞をまき、翌日 Lipofectamine2000 (Invitrogen)と Optimem (GIBCO)、各種 pcDNA プラスミドを用いてトランスフェクションを行った。試薬の添加から 24 時間後に培地の交換を行い、経代培養時に 250 µg/ml G418 硫酸塩(GIBCO)を培地に添加して、セレクションを行った。安定発現細胞では FACS Aria II (BD biosciences)を用いて Aggrus を高発現する細胞のソーティングを行った。その後限界希釈を行い、Aggrus 発現量が細胞株間で一定になるようにクローンを選択した。これらの細胞は通常の培養時に培地に 250 µg/ml G418 硫酸塩(GIBCO)を添加して培養した。

プラスミド作製

マルチクローニングサイトにヒト Aggrus cDNA を組み込んだ pcDNA3 ベクター、またヒト Aggrus cDNA の N 末から 24 アミノ酸の欠失した cDNA (Δ N24)を組み込んだ pGEX6P-3

ベクターを元に Site-Directed Mutagenesis 法で点変異/欠失変異を導入した。PCR 反応には KOD plus neo (東洋紡)を用いた。反応後の PCR 溶液 100 uL に 10 units の Dpn I (New England BioLabs)を加え、37 度で 3 時間インキュベートした。反応液を丁寧にピペティングで懸濁し、エタチンメイト(ニッポンジーン)を用いてニックの入ったプラスミド DNA 沈殿させた。乾燥の後、TE Buffer に溶解した。溶解した DNA 全量を用いて One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen)を形質転換し、100 µg/mL Ampicillin (Meiji seika ファルマ)を含む LB (BD Biosciences)寒天培地にまき、37 度で一晩培養した。翌日コロニーをピックアップし、液体培養の後、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)を用いてプラスミド DNA を採取した。プラスミド DNA の配列を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)、3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems)を用いてサンガーシーケンス解析し、正しく変異が導入されているプラスミド DNA を選択した。動物細胞へのトランスフェクションの際にはプラスミド DNA を EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen)で大量精製し、これを用いた。

マウス免疫用の抗原プラスミドは、Integrated DNA Technologies (IDT)で人工合成した。BamH1 (タカラバイオ) と Bgl2 (タカラバイオ)で制限酵素処理し、電気泳動後、illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)を用いて精製し、インサートとして用いた。ベクターは BamH1 のみで処理したものを用いた。ベクターとインサートを DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (タカラバイオ)を用いてライゲーションした。ライゲーション産物を大腸菌導入し、LB 寒天培地にまいた。コロニーPCR とシーケンス解析により正しいインサートの挿入を確認した。これを複数回繰り返し、リピート数を 12 回または 40 回まで増やした。この抗原遺伝子を BamH1 と Bgl2 で切り出し、BamH1 で切断した pGEX6P-3 ベクターへ載せ替えた。

動物実験

Jcl:ICR (8 週齢、雌)、BALB/c (4 週齢、雌)、BALB/c-*nu/nu* (5 週齢、雌)、C.B-17 SCID (5 週齢、雄)、NOD/SCID (5 週齢、雄)はチャールズリバーより購入した。全ての動物実験は(公財)がん研究会の IRB (治験倫理審査委員会)から承認を得たプロトコルに基づき実施した。

アラインメントとウィンドウ解析

Aggrus タンパク質配列は NCBI のリファレンスシーケンスから取得した。配列は 1 種につき 1 配列、代表的なアイソフォームを選択した。また、極端に相同性が低い配列は除いた。マルチプルアラインメントはヒト Aggrus のタンパク質配列を基準に種特異的な配列を

削除した。加えて、なるべくギャップが少なくなるようにアラインメントを実施した。実際に使用したタンパク質配列は私の博士論文[80]の Supplementary information からダウンロードできる。配列のアラインメントには MEGA6 software [81]の muscle アラインメントアルゴリズムを用いた。配列の並び順は MEGA6 により作成した系統樹を参考に、一番上をヒト配列としてツリーの並び順に合わせた。Sliding-window analysis は AL2CO program を用い、作製したマルチプルアラインメントに対し、window size = 3AA で実施した (<http://prodata.swmed.edu/al2co/al2co.php>)。Hydropathy plots は作製したマルチプルアラインメントに対して、window size = 3AA で Hydropathy score を算出し、EXCEL でグラフを作製した。アミノ酸のスコアリングには Kyte and Doolittle amino acid hydropathy scores [52]を用いた。

PCR

PCR は反応試薬に KOD plus neo、Emerald Amp MAX PCR Master Mix (タカラバイオ)を用いた。Emerald Amp はコロニーPCR 用としてメーカーのプロトコルに従って利用した。KOD plus neo はコロニーPCR 以外の Mutagenesis など正確な伸長反応が求められる実験で利用した。実験プロトコルはメーカーの案内に従った。サーマルサイクラーは Veriti (Applied Biosystems)、ProFlex (Applied Biosystems)を用いた。プライマーは以下に列挙した。

名前	配列(5'-3')
T7	TAATACGACTCACTATAGGGAG
SP6	TAGCATTTAGGTGACACTATAG
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 Reverse	GTCATAGCTGTTTCCTG
pGEX 5'-sequencing primer	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX 3'-sequencing primer	CCTCTGACACATGCAGCTCCCGG
ΔPLAG1-Fwd	ACAGGTTTGGAAAGGCGGCGTTGCCA
ΔPLAG1-Rev	TGGCTGGCCTGTGCTGGCTCCTTCT
ΔPLAG2-Fwd	GTTTGCCAGGTGCCGAAGATGATGTG
ΔPLAG2-Rev	CCTGGCAAACCTGTAGTCTCAGTGTCATC
ΔPLAG3-Fwd	GGCACCTGGCATGGCAACGCCGC
ΔPLAG3-Rev	CCAGGAACCAGCGAAGACCGCTATA
ΔPLAG4-Fwd	TCAGAAAGCACAGTCCACGCGCAAG
ΔPLAG4-Rev	GATGCGAATGCCTGTTACTACTGTTG

H76A-Fwd	GCAACAAGTGTCAACAGTGTAGCAGGCATTTCG
H76A-Rev	CAGATCCTCGATGCGAATGCCTGCTACAC
G77A-Fwd	ACAGTGTAACAGCCATTTCGCATCGAGGATC
G77A-Rev	CTCGATGCGAATGGCTGTTACACTGTTGAC
I78A-Fwd	AGTGTAACAGGGCGCTCGCATCGAGGATC
I78A-Rev	CTCGATGCGAGCGCCTGTTACACTGTTG
R79A-Fwd	CAGGCATTGCCATCGAGGATCTGCCAAC
R79A-Rev	CTCGATGGCAATGCCTGTTACACTGTTGAC
I80A-Fwd	CATTCGCGCCGAGGATCTGCCAACTTC
I80A-Rev	CCTCGGCGCGAATGCCTGTTACACTG
E81A-Fwd	GTGTAACAGGCATTTCGCATCGCCGATCTG
E81A-Rev	GCTTTCTGAAGTTGGCAGATCGGCGATG
D82A-Fwd	ATTCGCATCGAGGCTCTGCCAACTTCAGAAAG
D82A-Rev	TTGGCAGAGCCTCGATGCGAATGCCTG
L83A-Fwd	CGAGGATGCCCCAACTTCAGAAAGCACAGTC
L83A-Rev	GTTGGGGCATCCTCGATGCGAATGCCTG
P84A-Fwd	TCGAGGATCTGGCAACTTCAGAAAGCACAG
P84A-Rev	CTTTCTGAAGTTGCCAGATCCTCGATGCG
T85A-Fwd	CATTCGCATCGAGGATCTGCCAGCTTCAG
T85A-Rev	GTGGACTGTGCTTTCTGAAGCTGGCAG
S86A-Fwd	ATCTGCCAACTGCAGAAAGCACAGTCCAC
S86A-Rev	CTGTGCTTTCTGCAGTTGGCAGATCCTC
E87A-Fwd	TCTGCCAACTTCAGCAAGCACAGTCCAC
E87A-Rev	TGGACTGTGCTTGTGAAGTTGGCAGATC
S88A-Fwd	CCAACTTCAGAAGCCACAGTCCACGC
S88A-Rev	TGGACTGTGGCTTCTGAAGTTGGCAGATC
T89A-Fwd	TTCAGAAAGCGCAGTCCACGCGCAAG
T89A-Rev	TGGACTGCGCTTTCTGAAGTTGGCAGATC
Δ106-TSHS-109-Fwd	GCCACGGAGAAAGTGGATGGAGACAC
Δ106-TSHS-109-Rev	CGTGGCCACGTTTGGAGGCTGTGG

ウェスタンブロッティング

細胞を TENS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% aprotinin, and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) で溶解し、15000 rpm で 10 分遠心後、上清をライセートとして回収した。または SDS lysis buffer (0.5% SDS、5% glycerol、50 mM Tris-HCl、pH 7.5) で懸濁、煮沸することにより溶解しライセートを得た。ライセートのタンパク質量を BCA Protein Assay Kit (Pierce) で測定し、タンパク質量を調整した後に、SDS sample buffer (3% SDS、64 mM Tris-HCl pH 6.8、10% glycerol、0.01% bromophenol blue、2% 2-mercaptoethanol) を加え、5 分間煮沸した。Extra PAGE One Precast Gel (Nacalai tesque) を用いて SDS-PAGE を行った後、Immobilon-P PVDF membrane (Millipore) に転写した。5% スキムミルクを用いて、室温で 1 時間ブロッキングした後に 1 次抗体反応を 4 度、O/N で行った。2 次抗体は、ECL anti-Mouse IgG、HRP linked whole antibody (from sheep)、ECL Rat IgG、HRP-linked whole antibody (from goat)、ECL anti-Rabbit IgG HRP linked whole antibody (from donkey) (GE Healthcare)、mouse TrueBlot ULTRA (ROCKLAND)、HRP-Avidin (Invitrogen) を用いて、室温で 1 時間反応させた。3 回の洗浄の後、メンブレンを Amersham ECL Prime (GE Healthcare) で 5 分間インキュベーションし、LAS3000mini (FUJIFILM)、または Amersham Imager 600 (GE Healthcare) で検出した。

1 次抗体	メーカー	標的分子
PG4D1	In house	Aggrus
PG4D2	In house	Aggrus
MS-1	In house	Aggrus
P2-0	In house	Aggrus
D2-40	AbD Serotec, Dako	Aggrus
FL-162	Santa Cruz	Aggrus
NZ-1	Wako	Aggrus
H-300	Santa Cruz	von Willebrand factor
C-12	Santa Cruz	von Willebrand factor
Anti-GST (ab73934)	Abcam	GST
Anti- α -tubulin	Sigma Aldrich	α -tubulin

ビオチン化

コンフルエントになった細胞を 10 cm dish からはがし、PBS で 3 回洗浄した。次に、最終濃度 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように Premium Grade Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific)を加え、30 分 on ice でインキュベートし、細胞表面タンパク質をビオチン化した。反応後、100 mM glycine PBS で 3 回洗浄し、さらに PBS で 2 回洗浄し、細胞を-80 度で保存した。

免疫沈降

PBS 洗浄した細胞ペレットを IP lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 10% Glycerol, 0.1% aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)で溶解し、15000 rpm で 10 分遠心後、上清をライセートとして回収した。タンパク質定量の後、ライセート 450 μg と抗体 0.5 μg を混合し、on ice で 30 分反応させた。次に Protein G Mag Sepharose (GE Healthcare)を 1 サンプルにつき 5 μL 準備し、これにライセート-抗体反応液を加えた。これを 4 度で攪拌しながら 3 時間反応させた。IP lysis buffer で 5 回洗浄し、ビーズを回収後、2xSDS Sample buffer で煮沸した。以降はウェスタンブロッティングの方法に準じた。

vWF の免疫沈降実験では別項記載の方法で調製したヒト血漿を、生理食塩水(大塚製薬工場)で 3 倍希釈し、これをサンプルとして用いた。免疫沈降の前処理として、希釈ヒト血漿を洗浄した Protein A セファロース 4B ビーズ(Invitrogen)と 4 度、攪拌条件で 30 分間反応し(2 回実施)、ヒト由来の免疫グロブリンを除いた。5 mg (推定量) の血漿タンパク質と 2 μg の抗体(Control IgG, PG4D2, ab7356 (Millipore), H-300)を混合し、on ice で 1 時間反応させた。次に Protein G Mag Sepharose を 1 サンプルにつき 5 μL 準備し、これに血漿-抗体反応液を加えた。これを 4 度で攪拌しながら 3 時間反応させた。0.05 % Triton X-100, 生理食塩水で 5 回洗浄し、ビーズを回収後、2xSDS Sample buffer で煮沸した。以降はウェスタンブロッティングの方法に準じた。

ヒト血漿の調製

(公財)がん研究会の IRB (治験倫理審査委員会)から承認を得たプロトコルに基づき、健康人ドナーより採血した。採血の際に抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いた(終濃度 0.38 %)。採血した血液を 37 度、200 $\times\text{g}$ で 20 分間遠心し、上清を取得した。ここにプロスタグランジン I_2 (Sigma-aldrich)を終濃度 500 nM で添加し、37 度、1000 $\times\text{g}$ で 10 分間遠心した。上清を回収し、これをヒト血漿として実験に用いた。

Flow cytometry

1.5 x 10⁵ cells の細胞と抗 Aggrus 抗体(MS-1、P2-0、PG4D1、PG4D2: それぞれ 1 µg/ml、D2-40: 1/50、FL-162: 1/500)、または 1 µg/ml の Control IgG 抗体を on ice で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、4 µg/mL の 2 次抗体 Alexa Flour 488-conjugated anti-mouse IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific)、または Alexa Flour 488-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific) と on ice で 30 分間反応させ、測定を行った。CLEC-2 結合解析では、0.4 µg/mL の(His)₁₀-tagged human CLEC-2 (R&D systems) と on ice で 30 分間反応させ、PBS で洗浄後、500 倍希釈した Alexa Flour 488-conjugated anti-penta-His antibody (QIAGEN) と on ice で 30 分間反応させ、測定を行った。FACS 解析は Cytomics FC500 flow cytometry system (Beckman Coulter) を用いて実施した。FACS の定量は同一クローンの細胞を用いて、独立した実験を 3 回行った。測定値は以下の式に従って算出し、測定誤差は標準偏差で表した。

(Aggrus expression)

$$= \frac{(\text{各細胞の Aggrus 発現量のピーク値}) / (\text{各細胞のコントロールのピーク値})}{(\text{CHO/Aggrus 野生株の Aggrus 発現量のピーク値}) / (\text{CHO/Aggrus 野生株のコントロールのピーク値})}$$

(CLEC-2 binding)

$$= \frac{(\text{各細胞の CLEC-2 結合能のピーク値}) / (\text{各細胞のコントロールのピーク値})}{(\text{CHO/Aggrus 野生株の CLEC-2 結合能のピーク値}) / (\text{CHO/Aggrus 野生株のコントロールのピーク値})}$$

抗体による CLEC-2 結合阻害実験では、100 µg/ml の中和抗体(MS-1、PG4D1、PG4D2) と 1.5 x 10⁵ cells の CHO/Aggrus-WT 細胞を on ice で 30 分間反応させた後に、CLEC-2 タンパク質を 0.4 µg/mL となるように添加し、on ice で 30 分間反応させた。洗浄後、500 倍希釈した Alexa Flour 488-conjugated anti-penta-His antibody と on ice で 30 分間反応させ、測定を行った。CHO/Aggrus-D48A を用いた CLEC-2 結合阻害実験では、結合阻害させる抗体の濃度を 100 µg/mL (green area)、10 µg/mL (blue area)、1 µg/mL (red area)、0 µg/mL (open area) と振り分けた。

MS-1 抗体と PG4D2 抗体の競合アッセイでは DyLight594 antibody labeling kit (Thermo Scientific) を用いて MS-1 抗体と PG4D2 抗体に DyLight594 標識を行った。標識抗体 1 µg/mL と非標識抗体(1 µg/mL: red area、3 µg/mL: blue area、10 µg/mL: green area) を混合し、CHO/Aggrus-WT 細胞と on ice で 30 分間反応させ、測定を行った。

血小板凝集アッセイ

Jcl:ICR マウスをセボフルラン(和光純薬工業)で安楽死させた後、心臓穿刺により採血した。抗凝固剤には PBS で 10 倍希釈したヘパリン (持田製薬)を用いた。血液を 900 rpm、10 分で遠心後に PRP (Platelet rich plasma) を丁寧に採取した。PRP を 500 x g、10 分で遠心し、上清 (PPP; Platelet poor plasma)を回収した。沈殿した血小板を Tyrode's solution (137 mM NaCl, 11.9 mM NaHCO₃, 0.4 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 5.6 mM glucose)で 2 回洗浄し、Tyrode's solution に懸濁したものを Washed platelet とした。CHO 細胞での実験では、 6.5×10^8 platelets/mL、10 % PPP、400 μ M CaCl₂となるように調製した。各種 CHO 細胞は 1 アッセイにつき 1×10^6 cells 用いた。PC-10 細胞での実験では、 2×10^8 platelets/ml、2 % PPP、250 μ M CaCl₂となるように調製した。PC-10 細胞は 1 アッセイにつき 1×10^5 cells 用いた。血小板凝集の阻害実験では、細胞と抗体(抗体濃度 CHO 細胞: 10 μ g/mL, PC-10 細胞: 100 μ g/mL)を on ice で 30 分間反応させた後、アッセイに用いた。血小板凝集は血小板凝集能測定装置 (MCM HEMA TRACER 313M) を用いて、37 度で攪拌しながら凝集率を測定した。

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

96 well アミノプレート(MS-8696F; 住友ベークライト)に、PBS で 2%に希釈したグルタルアルデヒド(和光純薬工業)を 100 μ L 注ぎ、37 度で 2 時間インキュベートした。純水で 2 回洗浄し、1 ng/ μ L に希釈した抗原を 50 μ L 注ぎ、37 度で 2 時間インキュベートした。PBS で 2 回洗浄し、3%に希釈したスキムミルクを 200 μ L 注ぎ、4 度で O/N した。PBS で 2 回洗浄し、サンプル(抗血清、培養上清)を 50 μ L 注ぎ、室温で 1 時間インキュベートした。PBS で 2 回洗浄し、20000 倍希釈した anti-mouse IgG-Fc HRP (ab97265; Abcam)を 100 μ L 注ぎ、室温で 30 分間インキュベートした。PBS で 2 回洗浄し、1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Scientific)を 100 μ L 注ぎ、室温で 10 分間攪拌した。2 M の硫酸を 100 μ L 加えて発色反応を停止させ、Multiskan GO (Thermo Scientific)を用いて 450nm での吸光度を測定した。

抗原タンパク質の大量精製

構築した抗原プラスミドで BL21 DE3 (Invitrogen)を形質転換し、LB 寒天培地にまき、シングルクローンを得た。この大腸菌を 1 L の LB 培地で 37 度において液体培養し、OD600 が 0.5 になったところで、温度を 20 度に下げた。ここに IPTG(和光純薬工業)を 0.1 μ g/mL 添加し、抗原タンパク質を O/N で発現誘導した。培養液から大腸菌を 10000 x g、10 分で遠心し、回収した。ペレットを-20 度で凍らせ、再融解したものに BugBuster (Millipore)を加え、

大腸菌ライセートを得た。ライセートに Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare)を直接加え、4 度、rotate で 2 時間反応させた。反応液を 500 x g、10 分で遠心し、上清とビーズ画分を丁寧に分けた。ビーズは PBS で 3 回洗浄した後、Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM reduced glutathione, pH 8.0)を加え、抗原タンパク質を溶出させた。この過程を複数回繰り返し、回収した抗原タンパク質を PBS で透析し、精製タンパク質を得た。

セファロースビーズに抗原を結合させた際に、Prescission protease (GE Healthcare)を反応させることでフロースルーから、GST を切断した抗原タンパク質を得た。

ハイブリドーマ作製

作製した抗原を BALB/c マウス(5 週齢、雌)に免疫した。免疫に際して、アジュバントである TiterMax Gold (TiterMax USA)を用い、抗原とのエマルジョンを作製した。この際に抗原は 12 回/40 回タンデム抗原を 1:1 で混合して用いた。1 回の免疫につき 100 µg/mouse の抗原を免疫した。初回は頸部皮下と腹腔内に投与した。2 回目以降は腹腔のみに抗原を投与した。脾臓を摘出する前に抗体価の上昇を見込んだ免疫(Boost と表記)を行った。投与スケジュールは表(Table. 2-1)に記載した。

マウスを安楽死させた後、脾臓を摘出し、ここから脾細胞を回収した。脾細胞を洗浄し、1/3 量の P3U1 細胞と混合、PEG4000 (Merck)を用いて細胞を融合させた。融合の後、96well プレートに細胞をまき、エス・クロン クローニングメデューム CM-B (エーディア)培地で培養を行いながら、HAT 選択を行った。

アイソタイプの決定

作製した抗体のアイソタイプは Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit (AbD Serotek)を用いて決定した。プロトコルはメーカーの方法に準じた。

抗体精製

BALB/c-*nu/nu* マウスに Adjuvant Incomplete Freund (DIFCO) 0.5 ml を腹腔内投与し、その 2 日後に抗体産生ハイブリドーマ PG4D1 細胞、PG4D2 細胞および MS-1 細胞を 5×10^7 cells 腹腔内に移植した。1 週間から 2 週間後に腹水を採取し、8,000 x g、30 分、4 度で遠心、上清を回収し、5 µm filter (Millipore) を用いてろ過した。2 倍量の 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) を加え、NaOH で pH4.8 に調整後、ろ過した腹水の 0.04 倍量のカプリル酸(和光純薬工業)を加えて室温で 30 分攪拌した。9800 x g で 30 分間遠心した後に上清を回収し、

0.45 μm filter (IWAKI)でろ過後、PBS で透析を行った。0.45 μm filter でろ過後、等量の飽和硫酸 (pH7.0) を添加し、4 度、O/N で攪拌した。9800 x g、30 分、4 度で遠心後、沈殿物を PBS で溶解し、PBS で透析を行った。0.22 μm filter (IWAKI) でろ過し、Nanodrop2000 (Thermo Scientific)で抗体濃度の測定を行った。

Surface plasmon resonance (SPR)解析

SPR 解析は Biacore X100 (GE Healthcare)を用いて行った。初めにリコンビナントのヒト Aggrus-Fc タンパク質(R&D Systems)を CM5 センサーチップ(GE Healthcare)に 562 RU (レスポンスユニット)固定した。次にマウスコントロール IgG1 抗体を 5 濃度(3.7, 11.1, 33.3, 100, 300 nM)準備し、シングルサイクルカイネティクスにて測定を行った。シングルサイクルカイネティクスではアナライトとバッファーをセンサーチップ上に連続的に流すことで測定を行う。5 濃度の抗体を低濃度から流すことで階段状のセンサーグラムを得ることが出来る。チップの洗浄後、PG4D1 抗体を先の IgG1 抗体と同様に 5 濃度準備し、測定を行った。マウスコントロール IgG2a 抗体と PG4D2 抗体の測定に関しても、新しい CM5 チップを用いて同様の方法で行った。センサーグラムの解析は Biacore X100 evaluation software にて行った。Bivalent binding analyte model にてカーブフィッティングを行い、結合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)、および解離定数(K_D)を算出した。

Alphascreen

Aggrus-Fc タンパク質(1 ng/well)とマウスコントロール IgG1 抗体、マウスコントロール IgG2a 抗体、PG4D1 抗体、PG4D2 抗体、MS-1 抗体を各々96well マイクロプレート中で混合し、室温で 30 分インキュベートした。次に CLEC-2 タンパク質(30 ng/well)を加え、室温で 1 時間インキュベートした。この後、alphascreen アクセプタービーズ(Protein A Acceptor beads; AL101C, Perkin Elmer)、alphascreen ドナービーズ(Nickel Chelate Donor beads; AS101M, Perkin Elmer)をそれぞれ 800 ng/well ずつ加え、遮光下で 1 時間室温にてインキュベートした。その後、蛍光を結合強度として EnVision plate reader (Perkin Elmer)を用いて測定した。

細胞増殖アッセイ

PC-10 細胞を 3×10^3 cells/well/120 μL で 96well マイクロプレートに播種した。24 時間後、抗体濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように各 well に抗体を添加した。抗体添加後から 0 時間後(Day0)、24 時間後(Day1)、48 時間後(Day2)、72 時間後(Day3)の時点において、CellTiter-Glo Luminescent

Cell Viability Assay (Promega)を用いて、Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies)で発光シグナルを測定した。

実験的肺転移

BALB/c-*nu/nu* マウスの尾静脈から抗体を投与した。24 時間後、Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS, GIBCO)に懸濁した CHO/Aggrus 細胞(2.5×10^5 cells/mouse)を尾静脈から移植した。細胞の移植から 19 日後または 20 日後、マウスから肺を取り出し、ピクリン酸染色を行い、肺表面の転移結節数をカウントした。LC-SCC-015 細胞の実験的肺転移では、C.B-17 SCID マウスを用い、細胞数は 5×10^5 cells/mouse、細胞の移植から 31 日後に肺を取り出し、染色後、転移結節数をカウントした。

マウス Xenograft の治療実験

NOD/SCID マウスの皮下に HBSS に懸濁した PC-10 細胞(5×10^6 cells/mouse)を移植した。PC-10 細胞が生着し、腫瘍体積が 80mm^3 になった所で、抗体の投与を開始した。抗体の投与は週 2 回で、マウス Control IgG2a 抗体($200 \mu\text{g}/\text{mouse}$)、MS-1 抗体($100 \mu\text{g}/\text{mouse}$)、PG4D2 抗体($100 \mu\text{g}/\text{mouse}$)、抗体併用(Combo; MS-1 抗体と PG4D2 抗体を 1:1 で混合($50 + 50 \mu\text{g}/\text{mouse}$))を記載の dose で、マウスの尾静脈より投与した。マウスの体重及び腫瘍体積を抗体投与時に計測した。1 群 5 匹で実験を行った。

統計解析

FACS 解析、実験的肺転移、およびマウス Xenograft の治療実験において Mann-Whitney *U* test で有意差を検定した。P 値は* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ である。全ての統計解析は両側検定で実施した。

参考文献

1. Maemondo, M. *et al.* Gefitinib or Chemotherapy for Non–Small- Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.* 362, 2380–8 (2010).
2. Adams, R. H. & Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 464–478 (2007).
3. Sanz-Moreno, V. *et al.* ROCK and JAK1 Signaling Cooperate to Control Actomyosin Contractility in Tumor Cells and Stroma. *Cancer Cell* 20, 229–245 (2011).
4. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* 41, 49–61 (2014).
5. Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y.-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* 14, 1014–22 (2013).
6. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Perspective Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* 27, 450–461 (2015).
7. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B. & Johnston, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 13, 714–726 (2013).
8. Katayama, R. *et al.* Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7535–40 (2011).
9. Nguyen, D. X. & Massague, J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 8, 341–352 (2007).
10. Weigelt, B., Peterse, J. L. & Veer, L. J. Van. BREAST CANCER METASTASIS: MARKERS AND MODELS. *Nat. Rev. Cancer* 5, 591–602 (2005).
11. Francesco, F. & Dominick, J. A. Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome. *Nat. Rev. Cardiol.* 12, 30–47 (2015).
12. Daniel, B., Frederik, W., Christoph, G. & Marc, A. B. Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int. J. cancer.* 130, 2747–60 (2012).
13. Chao, N. J. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor ‘mobilized’ peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* 81, 2031–5 (1993).
14. Mehta, P. Potential role of platelets in the pathogenesis of tumor metastasis. *Blood* 63, 55–63 (1984).
15. Blom, J. W. *et al.* Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *J. Thromb. Haemost.* 4, 529–35 (2006).
16. Cooke, N. M. *et al.* Increased platelet reactivity in patients with late-stage metastatic cancer. *Cancer Med.* 2, 564–570 (2013).
17. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat.*

- Rev. Cancer* 3, 453–458 (2003).
18. Kunita, A. *et al.* The Platelet Aggregation-Inducing Factor Aggrus/Podoplanin Promotes Pulmonary Metastasis. *Am. J. Pathol.* 170, 1337–1347 (2007).
 19. Gay, L. J. & Felding-Habermann, B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 11, 123–34 (2011).
 20. Placke, T. *et al.* Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res.* 72, 440–448 (2012).
 21. Labelle, M., Begum, S. & Hynes, R. O. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell* 20, 576–590 (2011).
 22. Watanabe, M., Okochi, E., Sugimoto, Y. & Tsuruo, T. Identification of a Platelet-aggregating Factor of Murine Colon Adenocarcinoma 26: Mr 44,000 Membrane Protein as Determined by Monoclonal Antibodies. *Cancer Res.* 48, 6411–6416 (1988).
 23. Kato, Y. *et al.* Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 26, 195–200 (2005).
 24. Tsuruo, T. & Fujita, N. Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis. *Proc. Japan Acad. Ser. B, Phys. Biol. Sciences* 84, 189–198 (2008).
 25. Fujita, N. & Takagi, S. The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumour metastasis. *J. Biochem.* 152, 407–413 (2012).
 26. ZIMMER, G. *et al.* Cloning and characterization of gp36, a human mucin-type glycoprotein preferentially expressed in vascular endothelium. *Biochem. J.* 341, 277–284 (1999).
 27. Rishi, A. K. *et al.* Cloning, Characterization, and Developmental Expression of a Rat Lung Alveolar Type I Cell Gene in Embryonic Endodermal and Neural Derivatives. *Developmental Biology* 167, 294–306 (1995).
 28. Martín-Villar, E. *et al.* Characterization of human PA2.26 antigen (T1 α -2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 113, 899–910 (2005).
 29. Kimura, N. & Kimura, I. Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol. Int.* 55, 83–86 (2005).
 30. Matsutani, K. M. K. authorMika K. K. N. H. Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol.* 111, 483–488 (2006).
 31. Kunita, A., Kashima, T. G., Ohazama, A., Grigoriadis, A. E. & Fukayama, M. Podoplanin is regulated by AP-1 and promotes platelet aggregation and cell migration in osteosarcoma. *Am. J. Pathol.* 179, 1041–1049 (2011).

32. Takagi, S. *et al.* Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its role in pulmonary metastasis. *Int. J. Cancer* 134, 2605–2614 (2014).
33. Kazuhiko, M. *et al.* Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma. *Acta Neuropathol.* 111, 563–568 (2006).
34. Yuan, P. *et al.* Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 107, 563–569 (2006).
35. Ordóñez, N. G. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Hum. Pathol.* 36, 372–380 (2005).
36. Suzuki-Inoue, K. *et al.* A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood* 107, 542–549 (2006).
37. Suzuki-Inoue, K. *et al.* Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J. Biol. Chem.* 282, 25993–26001 (2007).
38. Schacht, V. *et al.* Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am. J. Pathol.* 166, 913–21 (2005).
39. Uhrin, P. *et al.* Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood* 115, 3997–4005 (2010).
40. Suzuki-Inoue, K. Essential in vivo roles of the platelet activation receptor CLEC-2 in tumour metastasis, lymphangiogenesis and thrombus formation. *J. Biochem.* 150, 127–132 (2011).
41. Kato, Y. *et al.* Molecular Identification of Aggrus/T1alpha as a Platelet Aggregation-inducing Factor Expressed in Colorectal Tumors. *J. Biol. Chem.* 278, 51599–51605 (2003).
42. Kaneko K, M., Kato, Y., Kitano, T. & Osawa, M. Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/podoplanin as a platelet aggregation-inducing factor. *Gene* 378, 52–57 (2006).
43. Kaneko, M. *et al.* Functional sialylated O-glycan to platelet aggregation on Aggrus (T1 α /podoplanin) molecules expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 279, 38838–38843 (2004).
44. Kaneko, M. *et al.* Functional glycosylation of human podoplanin: Glycan structure of platelet aggregation-inducing factor. *FEBS Lett.* 581, 331–336 (2007).
45. Nagae, M. *et al.* A platform of C-type lectin-like receptor CLEC-2 for binding O-glycosylated podoplanin and nonglycosylated rhodocytin. *Structure* 22, 1711–1721 (2014).
46. Nakazawa, Y. *et al.* Prevention of hematogenous metastasis by neutralizing mice and its chimeric anti-Aggrus/podoplanin antibodies. *Cancer Sci.* 102, 2051–2057 (2011).
47. Takagi, S. *et al.* Platelets Promote Tumor Growth and Metastasis via Direct Interaction between Aggrus/Podoplanin and CLEC-2. *PLoS One* 8, 1–11 (2013).
48. Kato, Y. *et al.* Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin

- antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 1301–1307 (2006).
49. Kaneko, M. K. *et al.* Chimeric anti-podoplanin antibody suppresses tumor metastasis through neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Sci.* 103, 1913–1919 (2012).
 50. Kato, Y. *et al.* Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci.* 99, 54–61 (2008).
 51. Pei, J. & Grishin, N. V. AL2CO: calculation of positional conservation in a protein sequence alignment. *Bioinformatics* 17, 700–712 (2001).
 52. Kyte, J. & Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132 (1982).
 53. Hughes, C. E. *et al.* CLEC-2 activates Syk through dimerization. *Blood* 115, 2947–2955 (2010).
 54. Watson, A. A. *et al.* The platelet receptor CLEC-2 is active as a dimer. *Biochemistry* 48, 10988–10996 (2009).
 55. Pollitt, A. Y. *et al.* Syk and src family kinases regulate c-type lectin receptor 2 (clec-2)-mediated clustering of podoplanin and platelet adhesion to lymphatic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 289, 35695–35710 (2014).
 56. Fernández-Muñoz, B. *et al.* The transmembrane domain of podoplanin is required for its association with lipid rafts and the induction of epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 886–896 (2011).
 57. Russ, W. P. & Engelman, D. M. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* 296, 911–9 (2000).
 58. Kato, Y. & Kaneko, M. K. A cancer-specific monoclonal antibody recognizes the aberrantly glycosylated podoplanin. *Sci. Rep.* 4, 5924 (2014).
 59. Zimmer, G., Lottspeich, F., Maisner, A., Klenk, H. D. & Herrler, G. Molecular characterization of gp40, a mucin-type glycoprotein from the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells (type I). *Biochem. J.* 326, 99–108 (1997).
 60. Steentoft, C. *et al.* Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 32, 1478–88 (2013).
 61. Deutscher, S. L., Nuwayhid, N., Stanley, P., Briles, E. I. B. & Hirschberg, C. B. Translocation across golgi vesicle membranes: A CHO glycosylation mutant deficient in CMP-sialic acid transport. *Cell* 39, 295–299 (1984).
 62. Ishida, N., Ito, M., Yoshioka, S., Sun-Wada, G. H. & Kawakita, M. Functional expression of human golgi CMP-sialic acid transporter in the Golgi complex of a transporter-deficient Chinese hamster ovary cell mutant. *J. Biochem.* 124, 171–178 (1998).
 63. Vanhoof, G., Goossens, F., De, M. I., Hendriks, D. & Scharpé, S. Proline motifs in peptides and

- their biological processing. *The FASEB Journal*. 9, 736–44 (1995).
64. Ogasawara, S., Kaneko, M. K., Price, J. E. & Kato, Y. Characterization of anti-podoplanin monoclonal antibodies: critical epitopes for neutralizing the interaction between podoplanin and CLEC-2. *Hybridoma* 27, 259–267 (2008).
 65. Oki, H. *et al.* Characterization of Monoclonal Antibody LpMab-7 Recognizing Non-PLAG Domain of Podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 34, 174–180 (2015).
 66. Kaneko, M. K., Oki, H., Ogasawara, S., Takagi, M. & Kato, Y. Anti-podoplanin Monoclonal Antibody LpMab-7 Detects Metastatic Lesions of Osteosarcoma. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 34, 154–161 (2015).
 67. Simon, F. D. M., Hans, D. & Karen, V. von Willebrand factor to the rescue. *Blood* 113, 5049–5057 (2009).
 68. Savage, B., Saldívar, E. & Ruggeri, Z. M. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84, 289–297 (1996).
 69. Sutherland, J. J., O'Brien, L. A., Lillicrap, D. & Weaver, D. F. Molecular modeling of the von Willebrand factor A2 domain and the effects of associated type 2A von Willebrand disease mutations. *J. Mol. Model.* 10, 259–270 (2004).
 70. Brondijk, T. H. C., Bihan, D., Farndale, R. W. & Huizinga, E. G. Implications for collagen I chain registry from the structure of the collagen von Willebrand factor A3 domain complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1–6 (2012).
 71. Staelens, S. *et al.* Paratope determination of the antithrombotic antibody 82D6A3 based on the crystal structure of its complex with the von Willebrand factor A3-domain. *J. Biol. Chem.* 281, 2225–2231 (2006).
 72. Kato, Y. *et al.* The chimeric antibody chLpMab-7 targeting human podoplanin suppresses pulmonary metastasis via ADCC and CDC rather than via its neutralizing activity. *Oncotarget* 6, 36003–18 (2015).
 73. Miyata, K. *et al.* Suppression of Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and pulmonary metastasis by a single-chain antibody variable region fragment. *Cancer Med.* 3, 1595–1604 (2014).
 74. Nakazawa, Y. *et al.* Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. *Blood* 112, 1730–1739 (2008).
 75. Jurasz, P., Alonso-Escolano, D. & Radomski, M. W. Platelet-cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.* 143, 819–826 (2004).
 76. Takagi, S., Takemoto, A., Takami, M., Oh-hara, T. & Fujita, N. Platelets promote osteosarcoma cell growth through activation of the platelet-derived growth factor receptor-Akt signaling axis. *Cancer Sci.* 105, 983–988 (2014).

77. Matsui, K., Breitender-Geleff, S., Soleiman, A., Kowalski, H. & Kerjaschki, D. Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14, 9–11 (1999).
78. May, F. *et al.* CLEC-2 is an essential platelet activating receptor in hemostasis and thrombosis. *Blood* 114, 3464–3473 (2009).
79. Chang, Y.-W. *et al.* Identification of a novel platelet antagonist that binds to CLEC-2 and suppresses podoplanin-induced platelet aggregation and cancer metastasis. *Oncotarget* 6, 42733–48 (2015).
80. Sekiguchi, T. *et al.* Targeting a novel domain in podoplanin for inhibiting platelet-mediated tumor metastasis. *Oncotarget* 7, 3934–46 (2016).
81. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729 (2013).

謝辞

本研究は(公財)がん研究会・がん化学療法センター・基礎研究部におきまして、藤田直也教授のご指導、ご鞭撻のもとに行わせて頂きました。大腸菌と進化の研究をしていた私に、1 からがん研究について、抗体の創製について、そして研究者として新薬を生み出していくことについて教えていただきました。先生の下で博士後期課程の研究を行えたことを本当に嬉しく思っております。心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、竹本愛博士、片山量平博士には多くの助言や議論をしてくださいました。深く御礼申し上げます。直接の指導をしていただきました竹本愛博士におきましては、特に感謝しています。先生の助力があったからこそ研究を遂行し切ることができたと思っております。

さらに佐藤重男主任研究助手、大原智子主任研究助手、高見美穂研究助手、小池清恵研究助手、高木聡博士の皆さまには実験手技の指導や多くのご支援を頂きました。皆様の研究に対する豊富な知識や経験があったからこそ、私が実験を成功させることができ、研究成果を出すことが出来たと思っております。とても心強い存在でした。深く感謝申し上げます。

最後に、藤田研究室に所属してからの 3 年間、家族や友人、特に永澤さん・田中君・宮田君の同期の皆には数多くのご支援をいただきました。そのおかげで中身の濃い、充実した研究生活を送ることが出来ました。皆様に心からの感謝を申し上げます。本当にありがとうございました。