



血小板凝集因子ポドプラニンの分子生物学的解析と抗体医薬開発

1. はじめに

がん細胞の血行性転移において、がん細胞による血小板凝集が認められることが古くから報告されている。がん細胞は血管に侵入すると、宿主の免疫系による攻撃を受け、また物理的衝撃により即座に破壊されるため、わずかながん細胞しか生き残れない。しかし、血小板凝集を引き起こすことにより、これらの過程から守られると考えられている。また、血小板凝集はがん細胞の血管内皮細胞への接着を促し、さらに増殖因子を放出することにより、がん細胞の局所的な増殖を引き起こす。がん細胞と血小板の凝集塊が毛細血管に詰まることも、血行性転移の促進に寄与している。このように、がん細胞による血小板凝集が転移形成に重要であることが示唆されていたが、近年我々は、がん細胞膜上に発現している血小板凝集因子ポドプラニンがその重要な因子であることを発見した。本稿では、ポドプラニンの機能部位解析から新規抗体医薬の開発に至るまで、我々の一連の研究成果について概説する。

2. ポドプラニンの機能部位解析

2003年、我々は、がん細胞上の血小板凝集因子ポドプラニン（別名：Aggrus/T1 alpha）の遺伝子クローニングに成功した¹⁾。他の研究グループにより、腎臓の podocyte（たこ足細胞）でポドプラニンが発見されたことからその名前が付けられ、特異的なリンパ管マーカーとしても使用されている。ポドプラニンはC末端に膜貫通部位を有したI型膜貫通型タンパク質である（図1A）。興味深いことに、ヒトポドプラニンはマウスポドプラニンと約39%のホモロジーにも関わらず、マウスの血小板凝集を引き起こし、逆に、マウスポドプラニンはヒトの血小板凝集を引き

起こす（図1B, C）。マウスポドプラニンに対する中和抗体（8F11）のエピトープ解析、および詳細な変異実験により、EDxxVTPGという配列（PLAG domain）のトレオニン（Thr）がポドプラニンによる血小板凝集の活性中心であり、種を超えて保存されていることが明らかとなった²⁾。この発見を契機に、ヒトポドプラニンに対する抗体医薬開発が急速に進んだ。

3. ポドプラニンの糖鎖構造解析

ポドプラニンはその分子量の約半分がO型糖鎖であり、その活性に重要であることが示唆されていた。まず、糖鎖合成不全の変異CHO細胞株（Lec1, Lec2, Lec8）を用いることにより、PLAG domainのThrに付加されているO結合型糖鎖のシアル酸が血小板凝集の活性中心であることがわかった³⁾。次に、質量分析計を用いてポドプラニンの糖鎖構造を解析した結果、ポドプラニンは m/z 1257の糖鎖を持つことがわかった（図2A）⁴⁾。さらに、 m/z 1257のMS/MS解析を行った結果、ポドプラニンには disialyl-core 1構造が付加されていた（図2B）。一方、ポドプラニンをAsp-Nで処理し、PLAG domainを含む糖ペプチド（Ala23-Glu57）を分離したところ、disialyl-core 1構造が1か所のみ付加されていた。

レクチンマイクロアレイを用いた解析によっても、同様の結果が示唆された^{4,5)}。すなわち、ポドプラニンは sialo-mucin 結合レクチンである *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) や Wheat germ agglutinin (WGA) に反応したが、core 1 結合レクチンである peanut agglutinin (PNA) や *Bauhinia purpurea* lectin (BPL) には反応しなかった。また、ポドプラニンをシアリダーゼ処理することにより、core 1 結合レクチンのシグナルが見られ、sialo-mucin 結合レクチンのシグナルが消失した。core 1 上のシアル酸の有無に関わらず結合する *Agaricus bisporus* agglutinin (ABA), *Amaranthus caudatus* agglutinin (ACA), *Maclura pomifera* agglutinin (MPA), Jaccalin には、予想通りポドプラニンのシアリダーゼ処理の有無に関わらず反応した。

ヒトポドプラニンのPLAG domainには、O結合型糖鎖付加部位が4か所ある。そこで、Edman分解法によりペプチドシーケンスを行った結果、Thr52のみに糖鎖が付加されていることが示唆された（図2C）。以上の詳細な解析により、ヒトポドプラニンによる血小板凝集の活性中心は、PLAG domainのThr52に付加されたdisialyl-core 1構造であることが明らかとなった。前述したPLAG domainの発見とともに、この一連の糖鎖構造解析の結果が、ポド

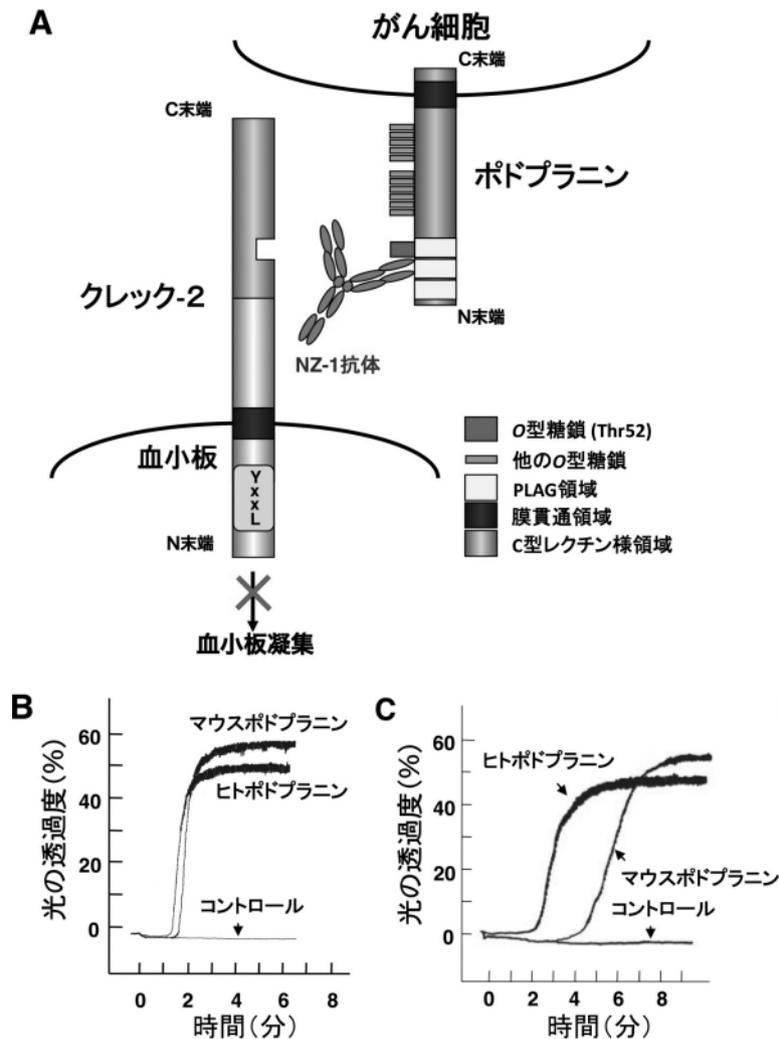


図1 NZ-1抗体によるポドプラニンとクレック-2の結合阻害

(A) ポドプラニン (Podoplanin) はC末端に膜貫通部位を有したI型膜貫通型タンパク質であり、血小板上のレセプターであるクレック-2 (CLEC-2) はN末端に膜貫通部位を有したII型膜貫通型タンパク質である。ポドプラニンのPLAG領域とクレック-2のC型レクチン様領域が結合し、血小板凝集が引き起こされる。ヒトポドプラニンでは、52番目ThrのO型糖鎖が重要な役割を果たしている。ヒトポドプラニンには、それ以外に11か所にO型糖鎖が付加されている (未発表)。ポドプラニンとクレック-2の結合をNZ-1抗体が中和し、ポドプラニンによる血小板凝集や転移促進が阻害される。マウスポドプラニンやヒトポドプラニンは、マウスの血小板凝集 (B) およびヒトの血小板凝集 (C) を引き起こした。血小板凝集は、細胞懸濁液の透過度の上昇で測定した。

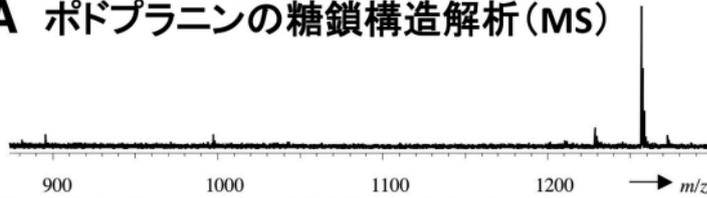
プラニンに対する抗体医薬開発を確実に前進させた。

4. ポドプラニンに対する抗体医薬開発

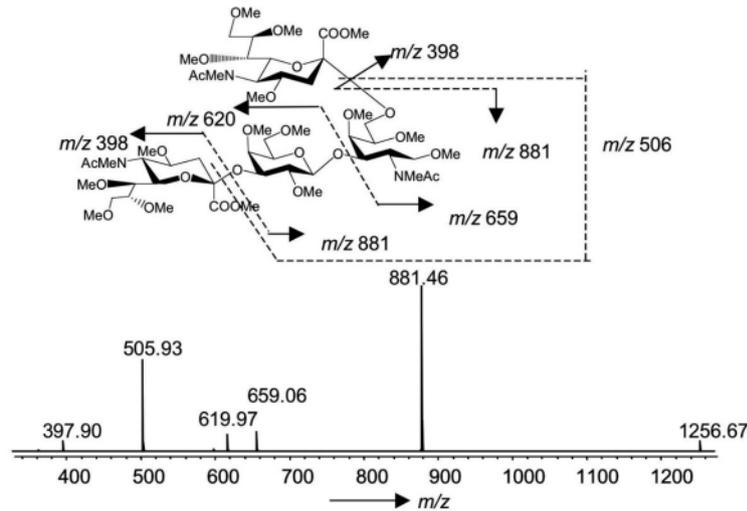
前述の通り、ポドプラニンは主にリンパ管マーカーとして利用されている (D2-40抗体が有名) が、悪性脳腫瘍、

肺扁平上皮がん、悪性中皮腫、精巣腫瘍などに高発現していることを我々は報告してきた⁸⁻¹¹⁾。特に、脳腫瘍の中でも星細胞系腫瘍 (astrocytic tumor) においては、悪性度と相関してポドプラニンが発現しており、腫瘍マーカーとしても有用である¹⁰⁾。ポドプラニンが高発現しているヒト腫

A ポドプラニンの糖鎖構造解析 (MS)



B ポドプラニンの糖鎖構造解析 (MS/MS)



C ポドプラニンの糖鎖付加部位解析 (エドマン分解)

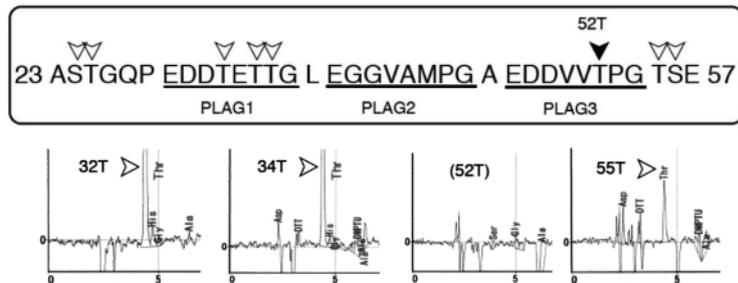


図2 ポドプラニン付加の糖鎖構造解析と糖鎖付加部位解析

(A) NZ-1 抗体を用いて、膠芽腫細胞 LN319 からヒトポドプラニンを精製した。精製したポドプラニンに付加されている糖鎖を切り出し、完全メチル化した後、質量分析計により構造を解析した結果、ポドプラニンは m/z 1257 の糖鎖を持つことがわかった。(B) m/z 1257 の MS/MS 解析により、ポドプラニンは disialyl-core 1 構造を持つことがわかった。(C) ポドプラニンの糖ペプチドを Asp-N 消化した後に HPLC により分画し、Ala52-Glu57 の糖ペプチドについて、Edman 分解を行った。いくつかの O-glycan 予想付加部位のうち、Thr52 のみ Thr のピークが消失しており、O-glycan が付加されていることがわかった。

瘍は、どれも有効な治療法が見つかっていないものばかりであり、ポドプラニンに対する抗体医薬開発はとても重要な課題である。しかも、ポドプラニンはリンパ管内皮細胞、腎や肺の上皮細胞などの正常細胞にも発現していることから、腫瘍選択性の高いモノクローナル抗体の開発を目

指す必要がある。

抗体医薬の開発には、まず標的分子を分子生物学的に詳細に解析すること必要がある。そして内在性の糖タンパク質を精製するには、感度・特異度の高い抗体が必須である。そこでまず、ヒトポドプラニンに特異度の高いモノク

ローナル抗体を作製した⁵⁾。その中でも、NZ-1抗体は、ウェスタンブロットやフローサイトメトリー、免疫組織染色に有用だけでなく、免疫沈降にも感度・特異度ともに高い。質量分析計を使った詳細な糖鎖構造解析（特にO結合型糖鎖）には数十 μg の精製タンパク質が必要となるが、ヒトポドプラニンを高発現しているヒト膠芽腫細胞LN319から、NZ-1抗体のアフィニティーカラムを用いてヒトポドプラニンを大量に精製した⁴⁾。NZ-1抗体は、ポドプラニンとそのレセプターであるCLEC-2⁶⁾との結合を阻害し（図1）、ポドプラニンによる血小板凝集も濃度依存的に阻害した⁵⁾。また、NZ-1抗体をポドプラニン発現細胞と共に尾静注すると、肺転移も有意に抑制した⁷⁾。すなわち、NZ-1抗体はポドプラニンの活性部位を認識し、ポドプラニンの全貌を明らかにするには好都合な抗体であっ

た。NZ-1抗体を樹立したことにより、前述の通り、ポドプラニンの糖鎖構造の解明が急速に進んだ。

さて、いよいよ次に抗体医薬開発に進むこととなる。まず、NZ-1抗体の親和性（affinity）を様々な手法で調べたところ、 K_D 値が0.1 nM以下という驚くべき高い親和性を示した¹²⁾。さらに、NZ-1抗体は、種々のヒト腫瘍細胞株への内在化（internalization）の活性が高いこともわかり、特に、毒素結合型抗体の開発に適していることもわかった^{12,13)}。一方、抗体医薬の開発においては、ADCC（antibody-dependent cellular cytotoxicity）活性やCDC（complement-dependent cytotoxicity）活性を持つかどうか重要なポイントとなる。そこでまず、NZ-1抗体をヒトキメラ型抗体（NZ-8）に改変したところ、ポドプラニンに対する高い親和性を保持していた¹⁴⁾。NZ-8抗体は、種々のポド

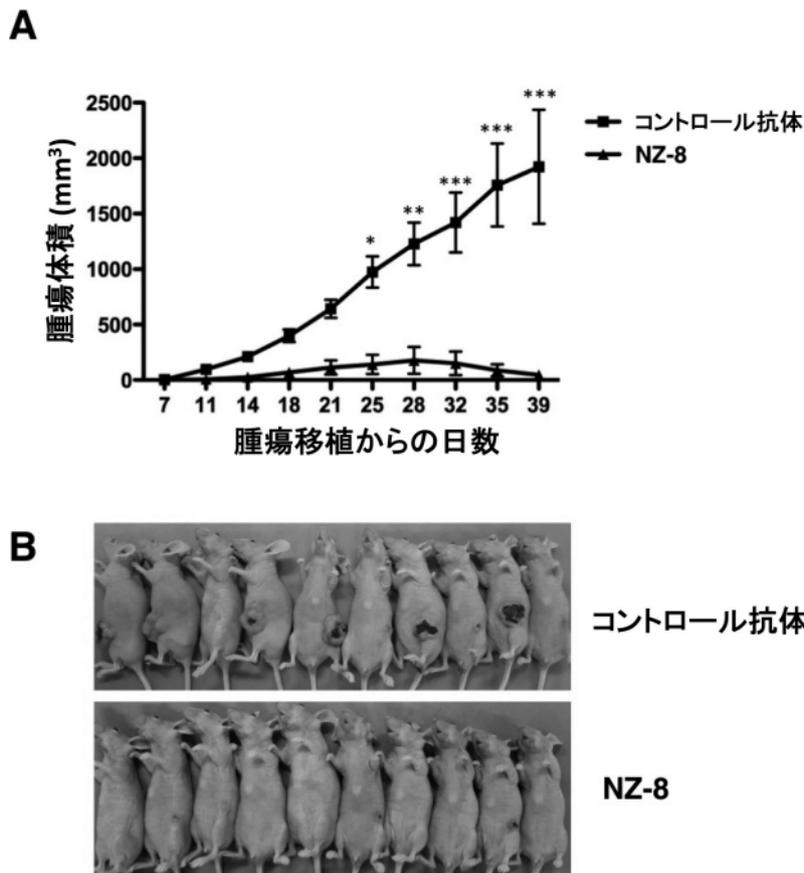


図3 ヒトキメラ型抗体（NZ-8）による抗腫瘍効果
CHO/hPod細胞をヌードマウスの皮下に移植し、NZ-8抗体による抗腫瘍効果を調べた。腫瘍を移植後、毎週100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で合計4回投与した。コントロール抗体では、非常に大きな腫瘍を形成するが、NZ-8抗体により、ほぼ完全に腫瘍が消失した。

プラニン発現株に対し、高いADCC活性やCDC活性を示した。さらに、ポドプラニン発現株を用いたマウス移植片モデルにおいては、NZ-8抗体は高い抗腫瘍活性を示した(図3)。このことから、抗ポドプラニン抗体(NZ-8)は、ポドプラニンによる血小板凝集やがん転移を抑制するだけでなく、ADCC/CDC活性による抗腫瘍活性を持ち、抗体医薬として有望な候補であることがわかった。

5. おわりに

これまで述べてきたように、抗体医薬の開発のためには、標的分子を徹底的に理解する必要がある。本稿では、ポドプラニンを題材として取り上げたが、他の糖タンパク質や糖脂質についても同様の戦略が必要となる。一方で、ポドプラニンは正常細胞にも発現が認められるため、副作用の低減のためには、腫瘍特異的な抗体を開発する必要がある。現在我々は、戦略的に腫瘍特異的抗体を作製する技術を開発しており、ポドプラニンに対する腫瘍特異的モノクローナル抗体の臨床応用に向けて研究を遂行している。

- 1) Kato, Y., Fujita, N., Kunita, A., Sato, S., Kaneko, M., Osawa, M., & Tsuruo, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 51599–51605.
- 2) Kaneko, M.K., Kato, Y., Kitano, T., & Osawa, M. (2006) *Gene*, **378**, 52–57.
- 3) Kaneko, M., Kato, Y., Kunita, A., Fujita, N., Tsuruo, T., & Osawa, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 38838–38843.
- 4) Kaneko, M.K., Kato, Y., Kameyama, A., Ito, H., Kuno, A., Hirabayashi, J., Kubota, T., Amano, K., Chiba, Y., Hasegawa, Y., Sasagawa, I., Mishima, K., & Narimatsu, H. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 331–336.
- 5) Kato, Y., Kaneko, M.K., Kuno, A., Uchiyama, N., Amano, K., Chiba, Y., Hasegawa, Y., Hirabayashi, J., Narimatsu, H., Mishima, K., & Osawa, M. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**, 1301–1307.
- 6) Suzuki-Inoue, K., Kato, Y., Inoue, O., Kaneko, M.K., Mishima, K., Yatomi, Y., Narimatsu, H., & Ozaki, Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 25993–26001.
- 7) Kato, Y., Kaneko, M.K., Kunita, A., Ito, H., Kameyama, A., Ogasawara, S., Matsuura, N., Hasegawa, Y., Suzuki-Inoue, K., Inoue, O., & Ozaki, Y., & Narimatsu, H. (2008) *Cancer Sci.*, **99**, 54–61.
- 8) Kato, Y., Sasagawa, I., Kaneko, M., Osawa, M., Fujita, N., & Tsuruo, T. (2004) *Oncogene*, **23**, 8552–8556.
- 9) Kato, Y., Kaneko, M., Sata, M., Fujita, N., Tsuruo, T., & Osawa, M. (2005) *Tumor Biol.*, **26**, 195–200.
- 10) Mishima, K., Kato, Y., Kaneko, M.K., Nishikawa, R., Hirose, T., & Matsutani, M. (2006) *Acta Neuropathol.*, **111**, 483–488.
- 11) Mishima, K., Kato, Y., Kaneko, M.K., Nakazawa, Y., Kunita, A., Fujita, N., Tsuruo, T., Nishikawa, R., Hirose, T., & Matsutani, M. (2006) *Acta Neuropathol.*, **111**, 563–568.
- 12) Kato, Y., Vaidyanathan, G., Kaneko, M.K., Mishima, K., Sri-

- vastava, N., Chandramohan, V., Pegram, C., Keir, S.T., Kuan, C.T., Bigner, D.D., & Zalutsky, M.R. (2010) *Nucl. Med. Biol.*, **37**, 785–794.
- 13) Chandramohan, V., Bao, X., Kaneko, M.K., Kato, Y., Keir, S. T., Szafranski, S., Kuan, C.T., Pastan, I., & Bigner, D.D. (2013) *Int. J. Cancer*, **132**, 2339–2348.
 - 14) Kaneko M.K., Kunita, A., Abe, S., Tsujimoto, Y., Fukayama, M., Goto, K., Sawa, Y., Nishioka, Y., & Kato, Y. (2012) *Cancer Sci.*, **103**, 1913–1919.

加藤 幸成

(東北大学大学院医学系研究科)

Characterization of platelet aggregation-inducing factor podoplanin and development of its antibodies
Yukinari Kato (Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan)

血管リモデリングにおける T 細胞の低酸素応答性転写因子の役割

1. はじめに

多細胞生物は、常に変動する生体内局所の酸素分圧に対して様々な機構を介して適応する。近年、低酸素に対する生体適応の異常や破綻が多くの疾患や病態の成立とその進展に密接に関わることが明らかになってきており、臨床医学的にも生体低酸素応答制御機構の本質的理解が要求されている。疾患に伴う低酸素環境は、虚血性疾患や腫瘍をはじめ代謝性疾患や炎症性疾患を含め多くの疾患で観察され、疾患の発動因子のみならず修飾因子として病態に関与している。低酸素応答性転写因子(hypoxia inducible factor: HIF)は、そのような生体内の酸素分圧の低下に伴い活性化される生体の低酸素ストレスに対する適応性を規定する分子として発見された¹⁾。

一方、近年、動脈硬化をはじめ血管病変の進展機序には、局所の炎症病態が深く関与していることが明らかになってきた。特に、このような病態局所では、細胞の増殖および代謝亢進に伴う細胞内のエネルギー消費が低酸素環境を引き起こし、その結果様々な細胞内シグナルを介してHIFが活性化されることが報告されている。我々は、動脈硬化や血管新生の病態において、血管リモデリングに関与する細胞群に発現するHIFがどのように機能し病態に関与するのかを分子レベルで理解するために、個体の細胞系