

CLEC2 と podoplanin の結合を阻害する低分子化合物の評価系の構築

Establishment of an assay system for small-molecule compounds that can inhibit interaction between CLEC2 and podoplanin

猪口 貞樹¹⁾、平山 令明²⁾、渡邊 伸央¹⁾、井上 成亮¹⁾、城所 正子¹⁾、田中 真紀子¹⁾

1) 東海大学医学部救命救急医学、2) 東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門

Sadaki Inokuchi¹⁾, Noriaki Hirayama²⁾, Nobuo Watanabe¹⁾, Shigeaki Inoue¹⁾, Msasako Kidokoro¹⁾, Makiko Tanaka¹⁾

1) Department of Emergency and Critical Care Medicine, School of Medicine, Tokai University

2) Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

血小板上 CLEC2 とガン細胞上の podoplanin との結合を妨げる低分子化合物は、抗腫瘍効果を示す可能性がある。本研究では、このような化合物を選別するため、これら 2 タンパク質とイムノグロブリン Fc 領域との融合タンパク質を作製し、2 タンパク質間の結合に対する化合物の阻害能を評価する系の構築を試みた。共沈降法を用いた検討結果、CLEC2-Fc と全長型 podoplanin により評価系構築ができる可能性が示された。また、podoplanin のガン細胞浸潤における役割解明のため、遺伝子編集法により podoplanin 遺伝子ヘテロ欠損 TE11 細胞を樹立した。

[Abstract]

Low-molecular weight compounds that can inhibit interaction between platelet CLEC2 and tumor cell surface podoplanin are expected to exhibit anti-tumor effects. In this study, we generated immunoglobulin Fc-fusion proteins of each protein and tried to establish an assay system for the assessment of inhibitory potency of small molecule compounds. Co-precipitation of full-length podoplanin with CLEC2-Fc was promising as an assay system although it still needs further improvement. For the clarification of podoplanin in cancer metastasis, using a gene editing methodology, we have generated TE11 cell clones that are defective in one of podoplanin alleles.

[Key Words]

podoplanin, CLEC2, small-molecule compound, protein-protein interaction, MET

1. はじめに

podoplanin は、リンパ管上皮や腎 podocyte に構成的に発現する糖タンパク質であり、様々な悪性腫瘍の進展・転移にも関与することが示唆されている[1]。CLEC2 は血小板上に発現する膜タンパク質で、podoplanin と結合すると、血小板活性化・凝集を誘導する[1, 2]。

抗 podoplanin 抗体は CLEC2 を介する血小板凝集を抑制し、免疫不全マウスに移植した podoplanin 陽性腫瘍細胞株の増殖と肺転移を抑制することから、podoplanin と CLEC2 の結合阻害が抗腫瘍効果を示す可能性が示唆されている[2, 3]。

これまでの我々の研究においても、podoplanin の発

現はヒト扁平上皮癌における独立予後規定因子であること、また podoplanin 陽性腫瘍細胞株において、podoplanin の発現抑制により TGF- β 依存性の腫瘍細胞浸潤と上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) が抑制されること等を確認している[4, 5, 6]。これらのメカニズムには未だ不明な点が多いものの、podoplanin の機能抑制は抗腫瘍剤の標的の一つと考えられる。

昨年度我々は、CLEC2 と podoplanin の結合を阻害する低分子化合物の *in silico* 探索を行い、同時に *in vitro* においてこれらの化合物の結合阻害効果を測定するための評価系の構築を細胞レベルで試みた。Podoplanin 遺伝子を HeLa 細胞、CLEC2 遺伝子を K562 細胞に導入した安定発現細胞を樹立し、細胞カウ

ント装置アレイ・スキャン(Thermo Scientific)を用いて細胞間接着を測定した。しかしながら、これら2種の細胞間接着は複数の接着分子によって担われているようであり、遺伝子未導入の親細胞間でも強力な細胞間接着が見られ、CLEC2とpodoplaninに依存した細胞間結合が識別できないことが判明した[7]。そこで、本年は非細胞系によるCLEC2とpodoplaninとの結合評価系の構築を試みた。

2. 結果の概要

1) CLEC2ならびにpodoplaninとイムノグロブリンのFc領域融合タンパク質の作成

CLEC2、podoplaninとも糖タンパク質であるため、哺乳類細胞での発現を目指した。一般に遺伝子組み換え糖タンパク質の発現では、目的のタンパク質と免疫グロブリンのFc領域とを融合タンパク質として哺乳類細胞で発現させ、培地中に分泌させることが多い(Fcがあるため、プロテインAで培地から容易に回収ができる)。また、CLEC2、podoplaninとも細胞外ドメインのFc融合タンパク質に関しては先例がある[8]。そこで、CLEC2とpodoplaninの全長または細胞外ドメインのみをFc領域に接続した発現ベクターを作成し(改変体はそれぞれ Δ C podoplanin、 Δ N CLEC2と表記、図1)、HEK293細胞で一過性に発現させた。その結果、細胞内においてはいずれのFc融合タンパク質も、全長型、細胞外ドメイン型とも同等に発現したが、培地中への分泌は細胞外ドメイン型の融合タンパク質のみに見られた(図1)。しかし、いずれの細胞外ドメイン融合タンパク質の分泌量もFc単体に比べると格段に低いものであった。最終的に Δ C podoplanin-Fc、 Δ N CLEC2-Fcとも一過性発現後のHEK293細胞の培地を回収し、プロテインAカラムを用いて精製を行った。

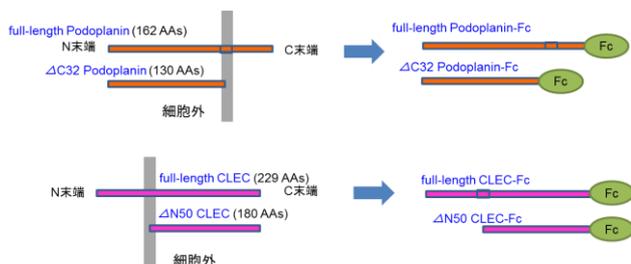


図1 全長ならびに細胞外領域のpodoplanin、CLEC2の模式図、ならびにそれらのFc融合タンパク質

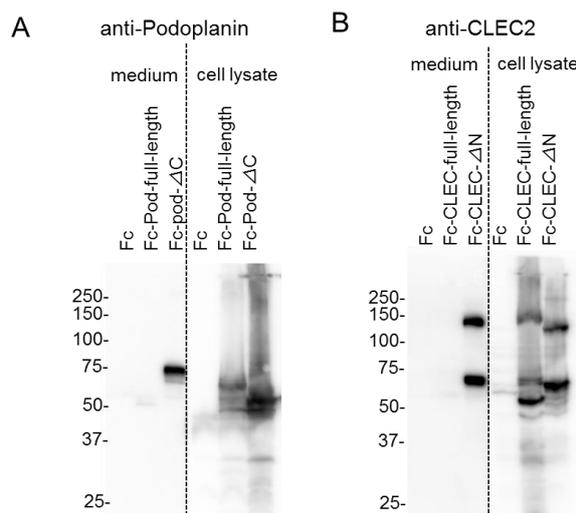


図2 HEK293細胞における全長ならびに細胞外領域のpodoplanin、CLEC2のFc融合タンパク質の細胞内での発現ならびに培地中への分泌

Δ N CLEC-Fcは60 kDaだけでなく、2量体と考えられる120 kDa分子も分泌されるが、還元剤で分離ができない。原因は不明

この結果、培地1.5リットルからそれぞれ約50 μ gのFc融合タンパク質が得られた。

2) CLEC2とPodoplaninの結合解析

培地から精製したCLEC-Fcと、昨年度樹立したpodoplanin過剰発現HeLa細胞(膜貫通領域を含む全長型が発現)のライゼートとを反応させ、その後、Protein A-アガロース・ビーズによってCLEC-Fcを沈降させ、podoplaninが共沈するかどうか調べた(図3A)。その結果、Pod-HeLa細胞ライゼートにCLEC-Fcを添加した場合のみ、約40 kDaの全長のpodoplaninの沈降が認められた(図3B 赤破線丸)。CLEC-Fcを添加せず、ライゼートとProtein Aビーズのみでは沈降しないことから、これは特異的な沈降であることが支持される。また、CLEC-Fc量を1/3(240 ng)にした場合、podoplaninの沈降は見られなかった。これは反応系のCLEC-Fc量が十分でないことを示唆する。PodoplaninとCLECとの結合は抗原抗体反応ほど強くないため、洗浄により外液中のpodoplaninが除去されると、新たな平衡状態へ向かい、CLEC-Fcからpodoplaninが解離することが予想される。実際、洗浄回数が多い場合や洗浄時間が長い場合に解離が起きるよう検出が困難になった。化合物の評価に先立ち、今後、2分子間の安定した結合検出条件を見つけ出す必要がある。

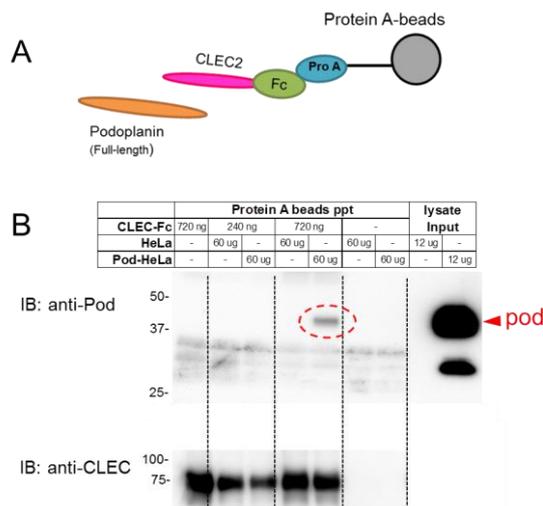


図3 沈降法による CLEC2-Fc と過剰発現 HeLa 細胞由来の Podoplanin との結合評価

(A) 評価系の模式図、(B) ウェスタンブロットによる共沈物の解析

赤丸破線は全長型の podoplanin が CLEC2-Fc の沈降により共沈していることを示す。

Podoplanin-Fc とヒト血小板由来の全長の CLEC2 も同様に共沈法による結合評価を行ったが、現時点では結合は検出できていない。

3) Podoplanin ノックアウト TE11 細胞の樹立

我々は扁平上皮ガン TE11 細胞の podoplanin の siRNA による一時的なノックダウンにより、podoplanin が増殖や EMT に関与することを示した [4]。今後、動物モデルで podoplanin のガン浸潤における役割を明確にするためには安定的な発現欠損細胞が必要である。そこで Crispr/Cas9 によるゲノム編集法 [9] により TE11 細胞の podoplanin 遺伝子のノックアウトを試みた [10]。本法のための all-in-one 型の発現ベクターを作成し、あらかじめ樹立した TE11 細胞サブクローンヘレクトロポレーションによって導入した。ノックダウンの成否をバルク状態の細胞集団で T7E1 アッセイによって検討した結果、いずれのベクターによってもノックダウン細胞が生じたことが確認された(図 4 右側の “bulk”)。そこで現在、限界希釈法によってノックダウン細胞のクローニングを行った。この結果、コンストラクト #2 導入細胞から得られた 3 クローンはいずれも親細胞であったが、コンストラクト #3 導入細胞から得られた 4 クローンのうちの 3 つは遺伝子欠損細胞であることが確認された。DNA シークエン

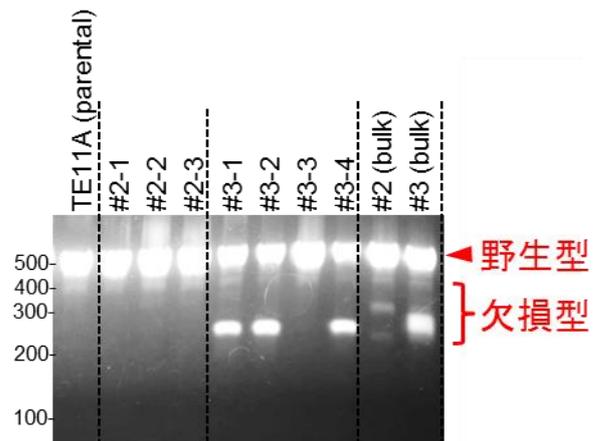


図 4 Crispr/Cas9 法による TE11 細胞の Podoplanin 遺伝子のノックダウン

T7E1 アッセイの結果、2 つの Crispr/Cas9 コンストラクト(#2、#3)とも、バルク状態でノックダウンを誘導したことが確認された[#2 (bulk)ならびに#3 (bulk)]。これらのクローニングを行った結果、コンストラクト #3 導入細胞から得られた 4 クローンは 3 つが 200 塩基欠損細胞であることが確認された。

スを行った結果、3 クローンは同一であり、片側の染色体の podoplanin 遺伝子においてイントロンとエクソンをまたぐ 200 塩基が欠損していることが確認された。今後、このクローンの反対側の染色体 podoplanin 遺伝子のノックアウトを行い、ホモの podoplanin 欠損細胞の樹立を目指す。

3. 展望

1) *in vitro* 評価系の構築と *in silico* 低分子阻害化合物の活性評価

- ① Podoplanin と CLEC2 との結合阻害評価系の確立
- ② *in silico* 探索では、既に 50 種類の候補化合物が得られており、入手可能なものから順に結合阻害能を評価する。ヒット化合物はさらに *in silico* ならびに本評価系での測定を重ねリード化合物を選抜する。
- ③ ヒット/リード化合物については、血小板-腫瘍細胞間の相互作用が阻害されるか否かを、血小板凝集、EMT 関連遺伝子の発現および細胞浸潤能の変化から検討する。

2) NOG マウスを用いた TE11 細胞の浸潤モデルの作成

- ① 今回樹立したヘテロノックダウン細胞にさらに Crispr/Cas9 法によってホモのノックダウン細胞を樹立する。
- ② マウスを用いたガン浸潤モデルを作成し、ノックアウト細胞ならびにヒット/リード化合物の効果測定

する。

4. 引用文献

- [1] Labelle M, et al. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell* 20, 576–590, 2011.
- [2] Takagi S, et al. Platelets Promote Tumor Growth and Metastasis via Direct Interaction between Aggrus/Podoplanin and CLEC-2. *PLoS ONE* 8(8) :e73609.2013.
- [3] Kaneko MK, et al. Chimeric anti-podoplanin antibody suppresses tumor metastasis through neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Sci.* 103 (11) :1913-9. 2012.
- [4] Wu Y et al. Podoplanin-mediated TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and its correlation with bHLH transcription factor DEC in TE-11 cells. *Int J Oncol.* 2016 Jun;48(6):2310-20.
- [5] Tanaka M, et al. Expression of podoplanin and vimentin is correlated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep.* 12(3):4029-36. 2015.
- [6] Ikoma Y. et al. Podoplanin expression is correlated with the prognosis of lung squamous cell carcinoma. *Biomed Res.* 2015;36(6):393-402.
- [7] 猪口貞樹 CLEC2 と podoplanin の結合を阻害する低分子化合物の探索 東海大学先進生命科学研究所紀要 第1巻 2017年3月
- [8] 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.* 2008 Jan;99(1):54-61.
- [9] Ran FA et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013 Nov;8(11):2281-2308.
- [10] Miyata K, et al. Podoplanin enhances lung cancer cell growth in vivo by inducing platelet aggregation. *Sci Rep.* 2017 Jun 22;7(1):4059.

5. 業績

【論文発表】

- [1] Wu Y, Liu Q, Yan X, Kato Y, Tanaka M, Inokuchi S, Yoshizawa T, Morohashi S, Kijima H. Podoplanin-mediated TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and its correlation with bHLH transcription factor DEC in TE-11 cells. *Int J Oncol.* 2016 48(6):2310-20.
- [2] Watanabe N, Suzuki Y, Yonezu T, Nakagawa Y, Shiina T, Hirayama N, Inokuchi S, Inoue S. A cell-based high-throughput screening assay system for inhibitor compounds of antigen presentation by HLA class II molecule. *Sci Rep.* 2017 28;7(1):6798.
- [3] Masuda R, Kijima H, Nito M, Wada A, Matsuzaki T, Ikoma Y, Nakazato K, Masuda D, Tanaka M, Kobayashi H, Inokuchi S, Iwazaki M. Lymphatic invasion is a significant indicator of poor patient prognosis in lung squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep.* 2017 15(4):2067-2073.

6. 謝辞

本研究を行うにあたり種々のご助言、援助をいただきました東海大学医学部生体防御学・佐藤健人准教授、赤塚尚子氏、再生医学研究センター八幡崇准教授、東海大学・教育研究支援センター・タンパク質部門・塚本秀雄博士、岡田千沙博士、佐々木氏に感謝いたします。