

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 腫瘍増殖・血行性転移を促進する血小板凝集促進分子ポドプラニン／
Aggrus を標的にした新治療法の開発
(英語) Development of novel anti-tumor therapies targeting platelet
aggregation-inducing factor podoplanin/Aggrus that facilitates tumor
growth and haematogenous metastasis
- 研究開発担当者 (日本語) 公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター 所長 藤田直也
所属 役職 氏名： (英語) Japanese Foundation for Cancer Research, The Cancer Chemotherapy
Center, Center Director, Naoya Fujita, Ph.D.
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 肺扁平上皮がん臨床検体からの培養細胞株・マウスゼノグラフトモデルの
開発課題名： 作製
(英語) Establishment of patient-derived cell lines and xenograft models from
lung squamous cell carcinoma specimens
- 研究開発代表者 (日本語) 公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター 所長 藤田 直也
所属 役職 氏名： (英語) Japanese Foundation for Cancer Research, The Cancer Chemotherapy
Center, Center Director, Naoya Fujita, Ph.D.
- 分担研究 (日本語) 開発候補品の抗腫瘍効果・転移抑制効果の検討とヒトポドプラニンノック
開発課題名： (英語) Estimation and development of humanized anti-podoplanin antibody
possessing anti-tumorigenic and anti-metastatic abilities and human
podoplanin knock-in mouse

研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター基礎研究部
研究員 竹本 愛
所属 役職 氏名: (英 語) Japanese Foundation for Cancer Research, The Cancer Chemotherapy
Center, Staff Scientist, Ai Takemoto, Ph.D.

分担研究 (日本語) ポドプラニン阻害活性を有する低分子化合物の創製
開発課題名: (英 語) Discovery of small molecular inhibitors targeting podoplanin function

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター
ケミカルバイオロジー研究グループ 専任研究員 近藤 恭光
所属 役職 氏名: (英 語) RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Chemical Biology
Research Group, Senior Research Scientist, Yasumitsu Kondoh, Ph.D.

分担研究 (日本語) ポドプラニン阻害活性を有する特殊環状ペプチドの同定
開発課題名: (英 語) Discovery of macrocyclic peptides inhibiting podoplanin function

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院理学系研究科化学専攻
助教 加藤 敬行
所属 役職 氏名: (英 語) Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of
Tokyo, Assistant Professor, Takayuki Katoh, Ph. D.

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

本研究開発課題で創製予定のポドプラニン標的薬の抗腫瘍効果・転移抑制効果を迅速にそして適切に評価するために、肺扁平上皮がん臨床検体からポドプラニン陽性の細胞株を樹立すると共に、その細胞株をマウスに移植したゼノグラフトモデル (PDX モデル) を事前に作製しておく必要がある。そこで、研究開発代表者の藤田と研究開発分担者である竹本は、肺扁平上皮がん臨床検体からポドプラニン陽性の細胞株樹立に取り組むとともに、重度免疫不全マウスへの可移植性を検討した。がん研究会有明病院の呼吸器外科の協力のもと、IC を取得した 75 検体から、これまでに 11 株の患者検体由来肺扁平上皮がん細胞株を樹立することに成功した。樹立した細胞株のポドプラニン発現を FACS 法、Immunoblot 法にて確認した結果、9 株でポドプラニン発現が認められた。そのうちの 4 株は、免疫不全マウスである BALB/c-nu や NOD SCID などへの移植が可能であった。創製予定のポドプラニン標的薬を臨床応用するためには、本薬剤が反応性を示す動物種での安全性試験を実施することが必須である。動物種間でのポドプラニンの相同性は低く、ヒトとマウスのポドプラニンのアミノ酸レベルでの相同性は 40%以下であるため、創製された薬剤がヒトのみに反応しマウスには反応しない可能性がある。そこで研究開発分担者である竹本は、血小板上受容体である

CLEC-2 との結合に関与するポドプラニン上の PLAG1 から PLAG4 ドメインをヒトの相同部位と置換したノックインマウス作製を行い、F1 ヘテロマウスをこれまでに 1 匹得ることに成功した。

ポドプラニンと CLEC-2 の結合を阻害するヒット化合物と構造的に類似した化合物にフォーカスしたライブラリーを構築するため、研究開発分担者である近藤は、入手可能な 530 万化合物の構造データとの類似度を独自のフィンガープリント法により計算し、化合物を選出した。これらの類縁化合物の購入、溶液化調製を行い、フォーカスド化合物ライブラリーを構築することに成功し、そのライブラリーを研究開発代表者の藤田グループに提供した。

研究開発分担者である加藤らは、ペプチドの N 末端にクロロアセチル基を導入し、下流のシステイン残基との間でチオエーテル結合を形成させることにより大環状化させたペプチドライブラリー（特殊環状ペプチドライブラリー）を試験管内翻訳合成法により作製した。また、得られたペプチドライブラリーをピューロマイシンリンカーを介して mRNA と連結することにより、RaPID ディスプレイ法に適用可能な形状とした。ポドプラニンを磁気ビーズに固定化し、RaPID ディスプレイ法を用いた特殊環状ペプチドのセレクションを試みたが、現在のところポドプラニンに特異的に結合するペプチド配列は得られていない。その原因としてはポドプラニン表面の糖鎖修飾がセレクションを阻害していることが考えられたため、糖鎖修飾を持たないポドプラニンを標的として再度ペプチドのセレクションを試みている。

英文

To develop new podoplanin-targeting drugs inhibiting tumor growth and metastasis, it is important to establish podoplanin-positive lung squamous cell carcinoma cell lines. So, Dr. Fujita and Dr. Takemoto firstly tried to establish patient-derived cell lines and patient-derived xenograft models from 75 lung squamous cell carcinoma specimens that were resected in our Institute JFCR Ariake hospital under informed consent. Until now, they succeeded to establish 11 patient-derived cell (PDC) lines. Flow cytometric and immunoblot analyses revealed that nine established PDC lines expressed podoplanin on their cell surface. Moreover, four PDC lines could form tumor when these cell lines were subcutaneously injected into immunodeficient BALB/c-nu or NOD SCID mice. To assess the side effects of the developing podoplanin-targeting drugs, they tried to generate human podoplanin knock-in mouse. PLAG domains are known to be associated with podoplanin binding to its platelet receptor CLEC-2. So, they planed to replace the murine PLAG domains with the corresponding human PLAG domains and finally succeeded to obtain one F1 heterozygous mouse.

To construct focused chemical library of compounds with analogous structures to hit compounds, Dr. Kondoh's group selected analogous compounds from 5.3 million of commercially available compounds by calculating their similarities by original fingerprinting approach. They constructed the focused chemical library by purchasing and dissolving these analogous compounds and provide it to Dr. Fujita's group.

Dr. Katoh and his colleagues constructed a macrocyclic peptide library by introducing chloroacetyl group to the N-terminus of random peptide, which reacts with the downstream cysteine residue to form a thioether bond and enables macrocyclization of

peptide. The peptide library was then conjugated with mRNA via puromycin linker so that the library can be applied for the RaPID display format. Then, podoplanin was immobilized on magnetic beads and mixed with the macrocyclic peptide library to fish out the specific peptide binders. However, podoplanin-binding peptides could not be successfully obtained so far, probably due to the sugar modification on the podoplanin protein. Therefore, Dr. Katoh is now restarting the *in vitro* selection using podoplanin that lacks sugar modification.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. Takeuchi S, Fukuda K, Yamada T, Arai S, Takagi S, Ishii G, Ochiai A, Iwakiri S, Itoi K, Uehara H, Nishihara H, Fujita N, Yano S. Podoplanin promotes progression of malignant pleural mesothelioma by regulating motility and contact inhibition. **Cancer Science**. 2017, In press.
2. Takemoto A, Okitaka M, Takagi S, Takami M, Sato S, Nishio M, Okumura S, Fujita N. A critical role of platelet TGF- β release in podoplanin-mediated tumour invasion and metastasis. **Scientific Reports**. 2017, 7, 42186.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Suppression of platelet aggregation and tumor metastasis by anti-podoplanin mAbs recognizing a novel CLEC-2 binding domain. ポスター, Takaya Sekiguchi, Ai Takemoto, Naoya Fujita, Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2016/4/18, 国外.
2. Podoplanin/Aggrus の新規血小板結合部位 PLAG4 の同定とそれを標的としたがん抑制, ポスター, 竹本愛, 西尾誠人, 藤田直也, 第 20 回日本がん分子標的治療学会, 2016/5/31, 国内.
3. 血小板による癌の微小環境・多様性の制御と治療への展開, 口演, 藤田直也, 第 24 回日本乳癌学会学術総会 2016/6/18, 国内.
4. がんの難治性に関わる治療薬耐性化と転移を克服する薬剤の探索, 口演, 藤田直也, 第 814 回千葉県がんセンター研究所集談会, 2016/8/24, 国内.
5. 高転移性がん細胞膜表面タンパク質 Podoplanin による血小板凝集を介した EMT の誘導と血行性転移の促進, ポスター, 竹本愛, 高木聡, 藤田直也, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.
6. ポドプラニンの新規血小板結合部位の阻害は血小板凝集とがん転移を抑制する, 口演, 関口貴哉, 竹本愛, 藤田直也, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 国内.
7. The role of podoplanin-mediated platelet aggregation in tumor growth in vivo, 口演, 宮田憲一, 竹本愛, 藤田直也, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当無し

(4) 特許出願
該当無し