

CLEC2 と podoplanin の結合を阻害する低分子化合物の探索

In silico and *in vitro* screening of small-molecule compounds which inhibit interaction between CLEC2 and podoplanin.

猪口 貞樹¹⁾、平山 令明²⁾、渡邊 伸央¹⁾、鈴木 雄祐¹⁾、井上 成亮¹⁾、城所 正子¹⁾、田中 真紀子¹⁾、鬼島 宏³⁾
東海大学医学部救命救急医学¹⁾、同先進生命科学研究所・医薬総合研究部門²⁾、弘前大学医学部病理学³⁾
Sadaki Inokuchi¹⁾, Noriaki Hirayama²⁾, Nobuo Watanabe¹⁾, Yusuke Suzuki¹⁾, Shigeaki Inoue¹⁾, Masako Kidokoro¹⁾, Makiko Tanaka¹⁾
and Hiroshi Kijima³⁾

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

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

³⁾Department of Pathology and Bioscience, School of Medicine, Hirosaki University,

[要旨]

CLEC2 と podoplanin の結合を妨げる化合物は抗腫瘍効果を示す可能性がある。本研究では、同結合を阻害する低分子化合物の *in silico* 探索を行い、さらに各化合物の阻害効果を測定するための *in vitro* 評価系の構築を行った。阻害剤候補として podoplanin のペプチド結合部位で 20 種、糖結合部位で 30 種の低分子化合物を選択し、また podoplanin および CLEC2 発現細胞株を樹立して評価系を構築した。

[Abstract]

Podoplanin is a transmembrane glycoprotein associated with tumor metastasis, malignant progression, and cancer stem cells. Podoplanin induced platelet-tumor cell interaction is a potential target for the development of an anti-cancer regimen. In this study, we searched 50 small-molecule compounds *in silico*, which specifically binds to CLEC2 and potentially inhibit interaction with podoplanin. To measure inhibitory effects of these compounds on CLEC2/podoplanin interaction, we developed an *in vitro* binding assay system.

[Key Words]

podoplanin, CLEC2, sialylated O-glycan, small-molecule compound, protein-protein interaction

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、様々な悪性腫瘍の進展・転移にも関与することが知られている。我々は昨年度までの研究で、ヒト扁平上皮癌における podoplanin の発現は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。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^{(1),(2)}。

CLEC2 は血小板上に発現する膜タンパク質で、細胞

膜上の podoplanin と結合し、血小板を凝集させる。これまでに、血小板との共培養により腫瘍細胞株は EMT 様変化を示すとともに、動物モデルでの肺転移が促進すること、これに血小板由来 TGF- β 1 が介在することが報告されている^[ref1]。また抗 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^{[ref2], [ref3]}、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。

そこで本年度は、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試みた。

2. 結果の概要

1) CLEC2 と podoplanin の結合を阻害する低分子化合物の *in silico* 検索

CLEC-2 と sialylated O-glycan および podoplanin との結合部位に強く結合する可能性のある低分子を別々に探索した。以下、sialylated O-glycan が結合する部位を糖結合部位、podoplanin が結合する部位をペプチド結合部位と呼ぶ。

in silico 探索の対象とする化合物群は、Sigma-Aldrich の試薬カタログにある 184,960 化合物と Chemical Computing Group 社が配布している leadlike な 653,214 化合物、合わせて 838,174 化合物である。これらの化合物について、安定な立体配座を複数発生して、探索対象の立体配座データベース（化合物 DB）を作成した。

複合体構造に基づき、各結合部位の特徴を統合計算化学システム MOE の Alpha Site Finder 機能を使用して解析した。各分子の結合性の評価には、結合自由エネルギーに相当する GBVI/WSA_dG を用いた。また、最適化された最終構造における原子団の 3 次元配置が当初設定した pharmacophore (Ph4) に近い化合物を選択した。さらに、Lipinsky が提案する医薬分子らしさおよび Oprea が提案するリード化合物らしさを満足する分子を最終的に選択した。

以上の探索により、阻害剤の候補として、ペプチド結合部位 20 種類、糖結合部位 30 種類、合計 50 種類の低分子化合物を選択した。

2) 化合物の阻害効果を測定するための *in vitro* 評価系の構築

Podoplanin ならびに CLEC2 発現細胞の樹立

健康人末梢血ならびに食道がん細胞株 TE11 細胞より cDNA ライブラリーを作成し、全長の podoplanin 遺伝子ならびに CLEC2 遺伝子をクローニングした。当初 CLEC2 遺伝子はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として産生すべく、GST 融合タンパク質発現ベクター (GEX 5X-1) に組み込み大腸菌内で発現させた。しかし、融合タンパク質は菌体内で不溶化し、精製が困難であったため断念した。そこで、糖鎖修飾を受けた天然型タンパク質として発現させるため、浮遊系の哺乳類細胞に過剰発現させることにした (図 1)。

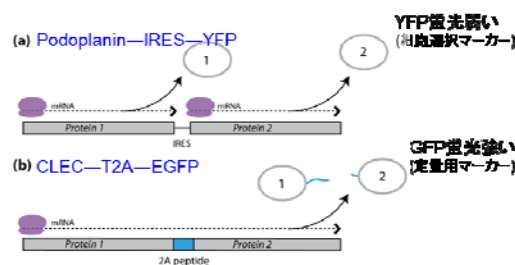
図1 CLEC2 過剰発現細胞と Podoplanin 発現細胞を用いた結合評価系



CLEC2 遺伝子の終止コドンを除き T2A 配列を介して GFP 遺伝子と融合させ、レンチウイルスベクター(CSID)に組み込んだ。これは翻訳時に 2A 配列がリボソーム上で切断され、CLEC2 と GFP がタンパク質レベルで 1 : 1 の比で生じるシステムである^[ref.4]。

一方、podoplanin 遺伝子は internal ribosome entry site (IRES) を介して YFP 遺伝子と連結し、レンチウイルスベクターに組み込んだ(CSID)。IRES を介した本発現系では、5'側の podoplanin に比べ YFP の翻訳効率は低くなることが知られている(図 2)。いずれの発現ベクターも DNA シークエンシングによって変異や欠損がないことを確認した。

図2 Podoplanin ならびに CLEC2 発現ベクター由来の模式図



Podoplanin については HeLa 細胞、CLEC2 ならびにその対照となる空ベクター(GFP のみ)についてはヒト骨髄腫 K562 細胞にトランスフェクトした。いずれの細胞も 10 日後以降に蛍光タンパク質を指

標としてセルソーターにて陽性細胞を分取した。

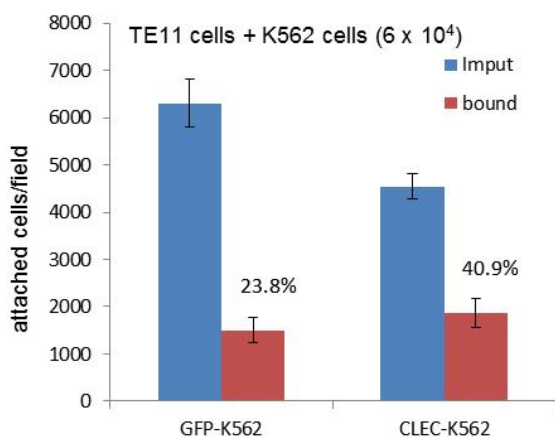
CLEC2 と Podoplanin の結合解析

96 ウェルプレートで TE11 細胞をコンフルエントの状態まで培養した。マニホールドアスピレーターで培地を除去し、CLEC2-K562 細胞または対照の GFP-K562 細胞を 3 または 6×10^4 個添加して 60 分インキュベートした。非接着細胞をマニホールドアスピレーター培地ごと除去し、新たに培地を加え振動を加えた。これを 6 回繰り返し非接着 K562 細胞を除去した。

TE11 細胞に結合した K562 細胞数は、本学の研究支援センターに設置されているアレイ・スキャン (Thermo Fisher Scientific) を用いて計測した。これは各ウェルの蛍光顕微鏡画像の中から特定の大きさと蛍光を発する細胞を高速でカウントする装置である。

図 3 のように CLEC2 を発現させた K562 細胞はコントロール細胞(GFP-K562 細胞)より TE11 細胞に多く結合した。しかし、コントロール細胞でも高い結合率を示した。

図3 CLEC-K562細胞と対照のGFP-K562細胞のTE11細胞への接着 バー上の数字は結合率を示す。



3. 展望

1) 低分子阻害化合物の *in silico* 検索

本研究では、既に 50 種類の候補化合物が得られている。下記評価系が完成次第、このうち GBVI/WSA_dG が高く入手可能なものから順に、結合阻害についてスクリーニングを実施する。

2) *in vitro* 評価系の構築

評価系の精度を向上させるため、以下を行う予定である。

現在の評価系で、CLEC2 発現 K562 細胞は非発現 K562 細胞より TE11 細胞に多く結合した。また、蛍光顕微鏡による観察においても CLEC2-K562 細胞は K562 細胞より podoplanin-HeLa 細胞に多く結合した。一方、これをアレイ・スキャンで計測すると、podoplanin-HeLa 細胞に共発現させている YFP の蛍光が GFP に取り違えられて正確な測定が困難なことが判明している。このため、今後は K562 細胞をヘキスト染色にて核染色して計測を試みる予定である。

K562 細胞は CLEC2 を過剰発現させていなくても TE11 細胞にある程度結合することが判明した。K562 細胞では内因性の CLEC2 の発現が高いか、非特異的結合がバックグラウンドに寄与している可能性がある。この場合には、他の浮遊細胞株に切り替える必要を考えている。

上記評価系が完成後に、候補化合物のスクリーニングを実施する予定であるが、結合阻害の見られた化合物については、血小板-腫瘍細胞間の相互作用が阻害されるか否かを、引き続き確認する必要がある。このため、podoplanin 陽性細胞株に血小板を添加して、EMT 関連遺伝子の発現および細胞浸潤能の変化を見る評価系を、並行して確立する予定である。

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] Szymczak AL, et al. Nat Biotechnol. 22 (5)
:589-94. 2004.

5.業績

【論文発表】

- (1) 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.
- (2) Ikoma Y. et al. Podoplanin expression is correlated with the prognosis of lung squamous cell carcinoma. Biomed Res. 2015;36(6):393-402.
- (3) 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.