

[原著]

calpain はがん転移における腫瘍細胞の遊走および浸潤に関与するが、 腫瘍細胞によって誘導される血小板凝集には関与しない

上 妻 行 則^{1,2,*} 田 代 ゆう子²
登 尾 一 平¹ 二 宮 治 彦²

Calpain is involved in tumor cell migration and invasion in cancer metastasis
but not tumor cell-induced platelet aggregation.

Yukinori KOZUMA, Yuko TASHIRO, Ippei NOBORUO, Haruhiko NIOMIYA

要旨

以前より腫瘍細胞が血小板凝集能を惹起し、血行性転移における遠隔臓器の血管内皮への接着に重要な役割を果たすと考えられているが、その分子メカニズムについて不明な点も多い。そこで本研究では、カルシウム依存性細胞内システインプロテアーゼである calpain に着目し、癌転移における calpain の役割について検討を行った。B16/BL6メラノーマ細胞株、colon-26直腸がん由来細胞株の遊走能、浸潤能はコントロールと比較し calpain 阻害剤、ALLN 添加により有意に抑制された。この傾向は他の calpain 阻害剤 EST, PD150606, calpastatin peptide 添加でも確認された。一方、過去の報告と同様に血小板凝集は腫瘍細胞添加によって惹起されたが、ALLN 添加で抑制できなかった。以上の結果から、calpain はがん転移における腫瘍細胞の遊走および浸潤に関与するが、腫瘍細胞によって誘導される血小板凝集には関与しないと考えられた。

キーワード：calpain, 遊走, 浸潤, がん転移, 血小板

I 緒言

科学の進歩に伴いがんの診断および治療は向上しているが、依然として転移は大きな障壁である。日本人の死因の第一位であるがん死のうち約90%が転移によるものといわれており、転移を阻止することはがん患者の予後改善や quality of life (QOL) 向上において重要である。

がんの転移の主要な経路のひとつである血行性転移は、①腫瘍細胞の原発巣での増殖、②原発巣からの腫瘍細胞の離脱と脈管（血管やリンパ管）への浸潤、③脈管内での移動、④遠隔臓器の血管内皮への

接着、⑤転移臓器への浸潤、⑥転移臓器内での増殖などの複雑な過程から構成されており、特に腫瘍細胞の遊走・浸潤というステップががん転移に大きな役割を担っている。

一方、心筋梗塞や脳梗塞などの血栓症は、がんと共に日本人の死因の上位を占めているが、以前より血小板が腫瘍細胞の転移に関与する可能性が知られている。1968年 Gasic らは、ノイラミニダーゼにより血小板減少を誘導したマウスでは、がんの転移が抑制されることを報告した⁽¹⁾。また、Nierodzik らによる抗血小板抗体投与マウスを用いた検討では、血小板を減少させるとがんの転移が抑制されること

所属

¹熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科

²筑波大学 医学医療系

*責任著者：kozuma18@kumamoto-hsu.ac.jp

が示された⁽²⁾。さらにはがん患者において血栓症発症が頻発することや血小板増加がみられるという報告もあり⁽³⁾、腫瘍細胞と血小板の両者には関連があると考えられている。

一方、腫瘍細胞が血小板活性化、特に血小板凝集能を惹起し、血行性転移における遠隔臓器の血管内皮への接着において重要な役割を果たすという報告がある。MG-63ヒト osteogenic sarcoma 細胞株を用いた検討では、細胞数に依存して血小板凝集能が惹起されること、さらにこの惹起された血小板凝集能が thromboxane A₂ receptor antagonist である SQ-29, 548の添加により抑制されることが報告された^(4,5)。また、腎臓系球体細胞上に発現している podoplanin が血小板凝集能を惹起する cyaloglicoprotein, aggrus であることが明らかとなり、がんの転移において重要な役割を担う可能性が見出された⁽⁶⁾。このように腫瘍細胞によって血小板凝集が惹起されるという報告は、1970年代より多数みられるものの、そのメカニズムや意義など不明な点も多い。

2006年、井上らは、血小板活性化蛇毒である rhodocytin の血小板上受容体として C-type lectin-like receptor 2(CLEC-2) を同定し、CLEC-2が podoplanin の受容体であることを見出した^(7,8)。さらに podoplanin 発現細胞の肺への転移を抗 podoplanin 抗体が抑制することや CLEC-2欠損マウスでの podoplanin 発現細胞の肺転移が抗 CLEC-2 抗体の投与により抑制されることなどが報告され、近年注目を集めている^(9,10)。しかしながら、血小板と腫瘍細胞の相互作用を分子レベルで報告した例は少なく、がんの転移における血小板の関与については未だ十分には明らかにされていない。

一方、腫瘍細胞の遊走 (migration) および浸潤 (invasion) を制御する分子は数多く示されている。2009年 Meng らによる A549ヒト肺がん細胞株を用いた研究では、細胞外基質の一種である fibronectin が focal adhesion kinase (FAK) を介して ERK1/2や phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)/Akt を活性化し、その下流で RhoA, matrix metalloproteinase (MMP)-9などが活性化されることが腫瘍細胞の遊走や浸潤に重要であるということが明らかとなった⁽¹¹⁾。また彼らは、Ca²⁺ 依存性細胞質内システインプロテアーゼである calpain が、がんの転移に関与する可能性も報告した。calpain

は、1964年に Guroff らにより初めてその存在が報告されて以来、種々の細胞においてその存在が確認され、現在までに calpain 1 (μ -calpain) や calpain 2 (m-calpain) など10種類を超える分子種が明らかとなっており、血小板には calpain 1, calpain 2の2種類が存在することが知られている⁽¹²⁻¹⁵⁾。不活性化型である80kDaの calpain は、Ca²⁺ の存在下で自己融解を引き起こし、78, 76kDaの活性化型へと変化することで基質タンパク質を切断する。calpainの基質として、細胞接着や運動に関与する actin, integrin, Rho, vimentin, さらに apoptosis の effector protein である caspase-3など様々な分子が報告されている⁽¹⁶⁻²³⁾。一方、calpain 自身が細胞運動の重要な regulator であることも明らかとなっている⁽²⁴⁾。しかしながら、がん転移に calpain が関与する可能性については、Meng らや Martín-Villar らにより報告されているものの^(10,25)、腫瘍細胞の遊走や浸潤に calpain が直接的に関与するか否かは依然明らかでない。

そこで本研究では、がん転移の過程における腫瘍細胞の分子メカニズムについて、calpain に着目し、calpain の関与について検討することを目的とした。

II 方法

試薬

calpain 阻害剤 ALLN, EST (loxistatin; E-64d), PD150606, calpastatin peptide (Ac-Asp-Pro-Met-Ser-ser-Thr-tyr-Ile-Glu-Glu-Leu-Gly-Lys-Arg-Glu-Val-Thr-Ile-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu-Leu-Leu-Ala-NH₂), calpastatin peptide (negative control; Ac-Ala-Pro-Arg-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Thr-Met-Tyr-Ile-Tyr-Ile-Tyr-Lys-Leu-Ser-Pro-Thr-Gly-ser-Glu-Lys-Leu-Gly-Asp-Glu-Arg-NH₂) は MERCK 社 (Darmstadt, Germany) から、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD41 (integrin α IIb) 抗体は Becton and Dickinson 社 (San Jose, CA, USA) から、FITC 標識ラット IgG_{1K} isotype control は BioLegend 社 (San Diego, CA, USA) から、その他本研究で使用した試薬は、Sigma Chemical 社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。

細胞株

B16/BL6 (C57BL/6系統マウスメラノーマ由来細

胞株) および colon-26 (BALB/c 系統マウス直腸がん由来細胞株) は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター (茨城) より購入し, 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamin, 1mM sodium pyruvate を含む RPMI-1640 (Sigma Chemical 社) 培地中で培養した。

reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR

培養した B16/BL6 細胞株および colon-26 細胞株をから RNA を抽出するために, phosphate-buffered saline (PBS) で細胞株を洗浄し, ISOGEN (ニッポンジーン社, 東京) を 1 mL 添加した。さらに 0.2 mL chloroform (和光純薬工業, 大阪) を添加し, 遠心 (12,000rpm, 15分, 4℃) した後, 上清を回収した。上清に isopropanol を混和した後, 遠心 (12,000rpm, 10分, 4℃) し, 上清を捨て, 70% ethanol を添加した。遠心 (15,000rpm, 30分, 4℃) 後, 上清を捨て, 乾燥させた後, diethylpyrocarbonate (DEPC) 水を加え全 RNA とした。RNA 1 μ g, Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) および Random Hexamer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて cDNA を合成した。cDNA 1 μ L, deoxynucleoside triphosphate (dNTP) mix 2 μ L, 10 \times PCR buffer 2 μ L, 下記のように設計した 10mM forward primer (Fw) 0.5 μ L, 10mM reverse primer (Rv) 0.5 μ L, H₂O 13.9 μ L, Takara Ex Taq 2.5 units (Takara 社, 滋賀) を PCR テンプレートとし, GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により 35-40 cycles 反応させた。

・ Murine calpain 1 cDNA (332 bp)
Fw: 5'AGTGAATGGCAGCTATGAGG3'
Rv: 5'CTGTCACTCCAGGGTCCTT3'

・ Murine calpain 2 cDNA (338 bp)
Fw: 5'GATCAATGGGTGCTATGAAG3'
Rv: 5'TTGTCATTCCACTTCCCGG3'

・ Murine β -actin cDNA (513 bp)
Fw: 5'TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG3'
Rv: 5'TTTGATGTCACGCACGATTTCC3'

細胞遊走能測定

1) migration assay

BD BioCoat Control Inserts 24-Well Plate 8.0 micron (Becton and Deckinson) の insert に B16/BL6 細胞株または colon-26 細胞株を, plate に fibronectin (和光純薬工業, 10 μ g/mL) を含む培地を添加し, 37℃, 5% CO₂, 湿潤下で 6-12 時間培養した。培養後 insert 内に残った細胞を除去後, ライト染色を施し, 遊走した細胞数を顕微鏡下で測定した。

2) wound healing assay

Falcon plate (24well, Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) に B16/BL6 細胞株を 3.0×10^5 /well 播種後, 37℃, 5% CO₂, 湿潤下で培養し confluentであることを顕微鏡にて確認後, 200 μ L チップで well の中央部を一直線に傷つけ, 傷つけ直後の傷の幅 (a) および 16 時間培養後の傷の幅 (b) より, % wounded area field = (a-b) / a \times 100 を算出した。

細胞浸潤能測定

in vitro 基底膜モデルであるマトリゲルがメンブレン上部に薄層された BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber 24-Well Plate (8.0 μ m) (Becton and Deckinson) を用いて, migration assay と同様の条件で培養し, 浸潤した細胞数を顕微鏡下で測定した。

血小板の調整

日本チャールス・リバー社 (神奈川) より購入した C57BL/6N マウス (雌, 8 週齢) をイソフルランで麻酔した後, 15% acid citrate dextrose (ACD) 存在下で全血採取した。採取した血液を遠心 (1,000rpm, 10分, 室温) し, platelet rich plasma (PRP) を分離した。PRP は, 10% ACD 加 HEPES-Tyrode buffer (137mM NaCl, 2mM KCl, 0.4mM NaH₂PO₄, 1mM MgCl₂, 5.6mM glucose, 0.1% [w/v] bovine serum albumin, 20mM HEPES, pH 7.4) に浮遊させた後, 1,700rpm, 20分, 室温で遠心して洗浄し, 2mM CaCl₂ 存在下で HEPES-Tyrode buffer に再浮遊させ, 洗浄血小板 (2.5 $\times 10^5$ / μ L) を得た。本研究は, 筑波大学動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号: 第11-350号)。

血小板凝集能測定

B16/BL6 細胞株および colon-26 細胞株は HEPES-Tyrode buffer で 5.0×10^7 /mL に調整した。血小板

浮遊液200 μ Lに各腫瘍細胞浮遊液22 μ Lを添加し、Easy TRACER ET-800（東京光電、東京）にて血小板凝集能を測定した。

腫瘍細胞への血小板の接着

血小板浮遊液は $1.0 \times 10^6 / \mu\text{L}$ 、B16/BL6細胞株は $5.0 \times 10^5 / \text{mL}$ に調整し、腫瘍細胞に血小板浮遊液を添加した後、血小板表面に発現する糖タンパクである glycoprotein IIb(CD41) を FITC 標識抗 CD41 抗体で染色し、flow cytometry (FACSCan, Becton and Deckinson) にて測定した。

統計処理

2群の平均値の比較には、Microsoft Excel

(Microsoft 社, Seattle, WA, USA) を用いて、Student *t* 検定を行った。

III 結果

腫瘍細胞における calpain の発現

本研究で選択した腫瘍細胞、B16/BL6細胞株および colon-26細胞株に calpain 1, calpain 2 が発現しているか否かを検討するために RT-PCR を行ったところ、いずれの細胞株においても calpain 1 および calpain 2 mRNA の発現が認められた (図 1)。

腫瘍細胞遊走能における calpain の関与

腫瘍細胞の遊走における calpain の関与を明らか

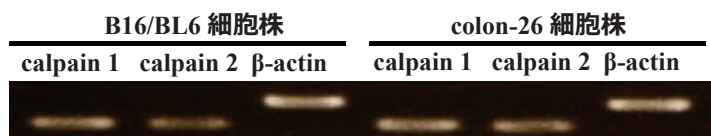


図 1. 腫瘍細胞における calpain 1, 2 の発現

B16/BL6細胞株および colon-26細胞株より RNA を採取し、RT-PCR を行ったところ、calpain 1 および calpain 2 mRNA の発現が認められた。

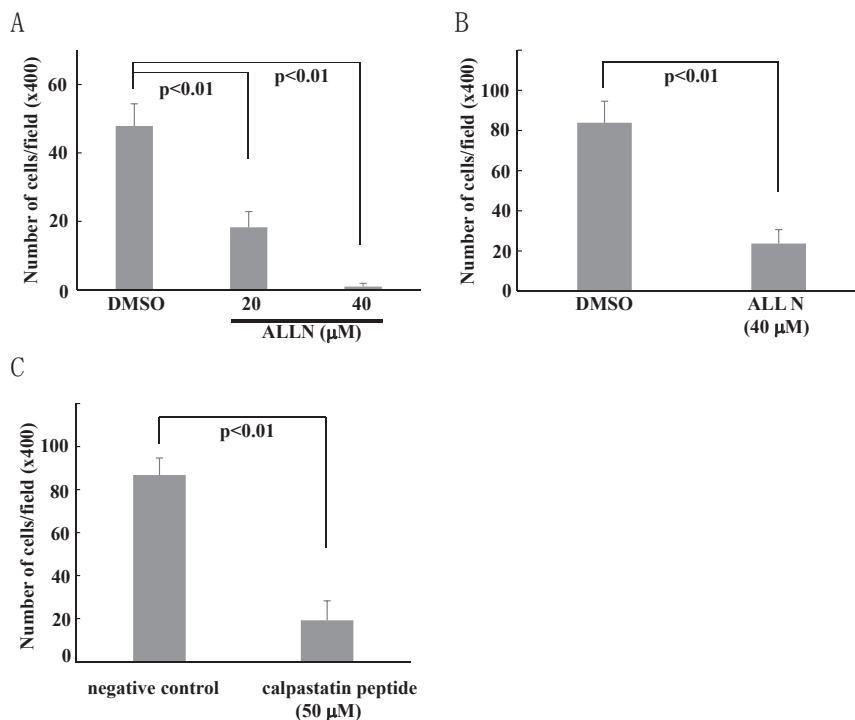


図 2. 腫瘍細胞遊走能における calpain の関与

A, B: B16/BL6細胞株 (A) または colon-26細胞株 (B) に calpain 阻害剤, ALLN を添加し, migration assay を行った。図に mean \pm SD (n=3) を示す。

C: B16/BL6細胞株に calpain peptide を添加し, migration assay を行った。図に mean \pm SD (n=3) を示す。

にするために、ダブルチャンバーを用いた migration assay を行った。B16/BL6細胞株に calpain 阻害剤 ALLN またはコントロールとして dimethyl sulfoxide(DMSO) を添加し、培養したところ、遊走した細胞数はコントロールと比較し、ALLN 添加により濃度依存性かつ有意に低下した(図2-A)。また ALLN 添加による遊走細胞数の低下は、colon-26細胞株でも同様に認められた(図2-B)。さらに、calpain の内在性阻害タンパクである calpastatin の27アミノ酸残基の細胞膜透過型ペプチドである calpastatin peptide を B16/BL6細胞株に添加したところ、コントロールと比較して有意に遊走細胞数が低下した(図2-C)。このような遊走細胞数の低下は、別の calpain 阻害剤である EST や PD150606 を添加した場合でも認められた(data not shown)。

そこで次に、wound healing assay による評価を行った。wound healing assay は、図3-A に示すように、培養により confluent になった well の中央部を傷つけ、傷つけ直後の傷の幅 (a) および16時間

培養後の傷の幅 (b) により遊走能を評価する方法である。B16/BL6細胞株を用いて検討したところ、ALLN 添加により % Wounded area field も有意に低下した(図3-B)。

腫瘍細胞浸潤能における calpain の関与

次に、がん転移において重要な役割を担う腫瘍細胞の浸潤に calpain が関与するか検討を行った。B16/BL6細胞株、colon-26細胞株を ALLN 存在下で培養したところ、いずれの細胞においても、ALLN 添加によりメンブレン下部へ浸潤した細胞数は有意に低下した(図4)。

腫瘍細胞と血小板の接着と血小板凝集能

血栓症ががん患者に頻発するという報告から⁽³⁾、近年では腫瘍細胞と血小板が接着することが、腫瘍細胞の血管内での移動および転移臓器の血管内皮への接着に極めて重要であると考えられている。そこで、腫瘍細胞と血小板が接着するか否かについて検討した。まず予備検討として B16/BL6細胞株への

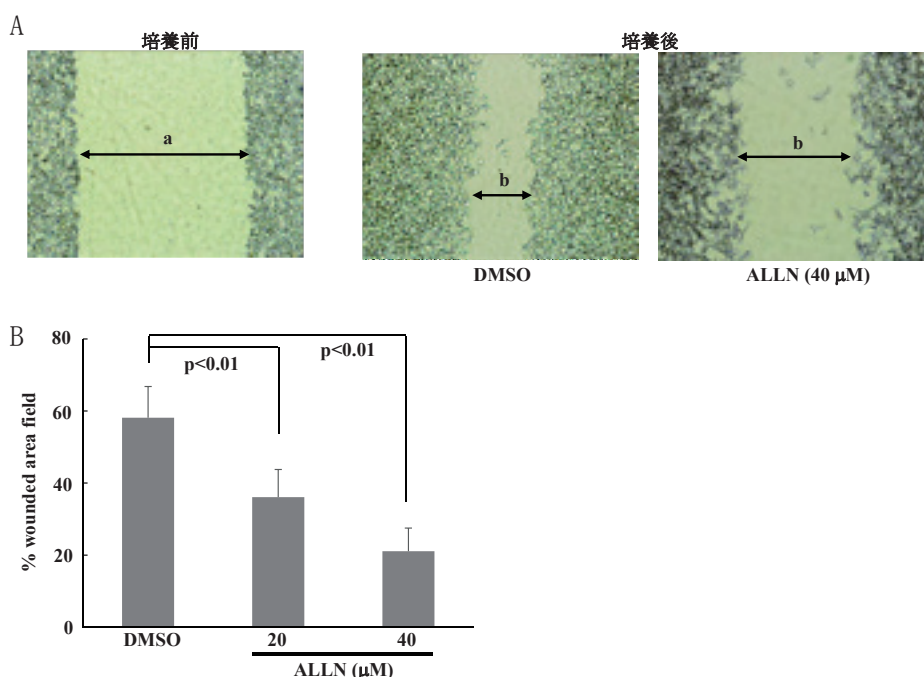


図3. wound healing assay を用いた腫瘍細胞遊走能の評価

A : B16/BL6細胞株を BD BioCoat Control Inserts 24-Well Plate 8.0 micron にて培養し、confluentであることを顕微鏡にて確認した後、200μLチップでwellの中央部を一直線に傷つけ、傷つけ直後の傷の幅 (a) および calpain 阻害剤、ALLN または DMSO を培地に添加し、16時間培養後顕微鏡下の傷の幅 (b) より、% wounded area field = (a-b)/a × 100 を算出した。図には培養前 (傷つけ直後)、培養後顕微鏡下で観察した代表的な写真を示す。

B : B16/BL6細胞株に ALLN を添加し wound healing assay を行った。図に mean ± SD (n=3) を示す。

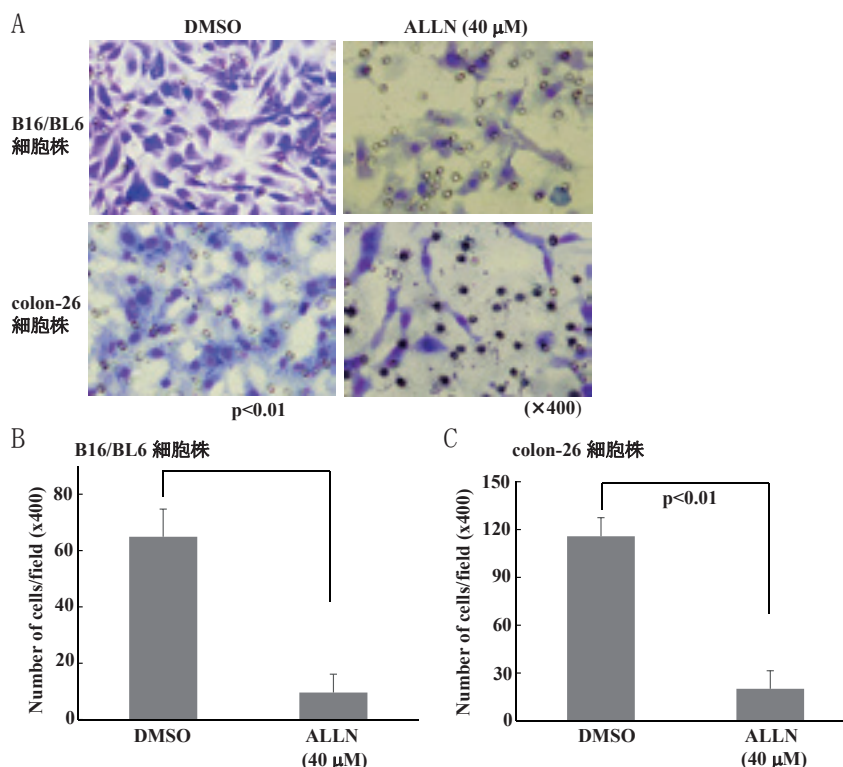


図4. 腫瘍細胞浸潤能における calpain の関与

A : B16/BL6細胞株または colon-26細胞株に calpain 阻害剤, ALLN または DMSO を添加後, BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber 24-Well Plate(8.0μm) にて培養し, 浸潤能を顕微鏡下で測定した。図には代表的な写真を示す。

B : B16/BL6細胞株 ALLN を添加し, 浸潤能を測定した。図に mean ± SD(n=3) を示す。

C : colon-26細胞株 ALLN を添加し, 浸潤能を測定した。図に mean ± SD(n=3) を示す。

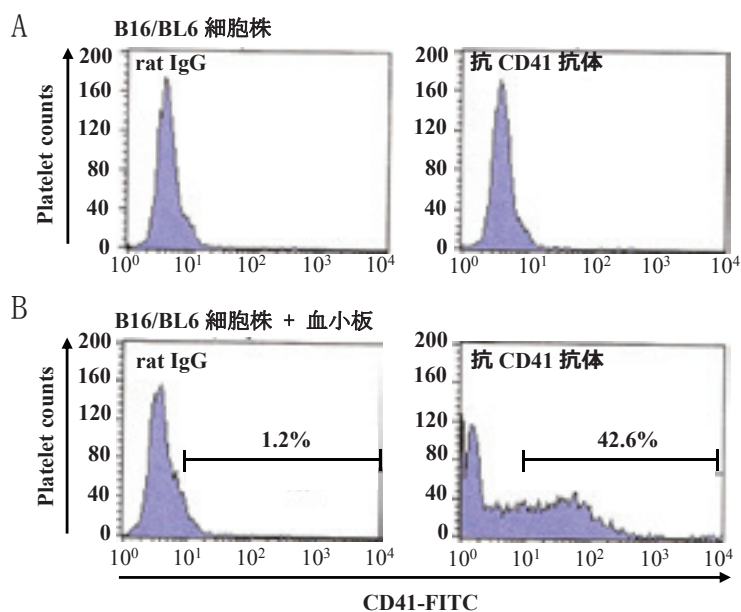


図5. 腫瘍細胞と血小板の接着

B16/BL6細胞株に血小板浮遊液を添加した後, 血小板を FITC 標識抗 CD41抗体または FITC 結合 rat IgG で染色し, flow cytometry にて測定した。

血小板の接着を評価するために、血小板の表面マーカーである CD41 が発現しているか否か flow cytometry で確認したところ、抗 CD41 抗体陰性であり、B16/BL6 細胞株の細胞表面に CD41 の発現は認められなかった (図 5-A)。そこで、B16/BL6 細胞株と血小板を混和し、B16/BL6 細胞株と血小板が接着するか検討した結果、42.6% の B16/BL6 細胞株が抗 CD41 抗体陽性となった (図 5-B)。

次に、腫瘍細胞の添加が血小板凝集を惹起するか検討した。B16/BL6 細胞株または colon-26 細胞株を血小板浮遊液に添加すると、血小板凝集が認められ、最大凝集率は B16/BL6 細胞株で 38.3%、colon-26 細胞株で 35.6% であった (図 6-A, B)。そこで最後に、腫瘍細胞によって惹起される血小板凝集に calpain が関与するか calpain 阻害剤、ALLN を用いて検討したが、腫瘍細胞添加による血小板凝集能に変化はなかった (図 6-C)。

IV 考察

止血において血小板は主要な役割を担うが、がん転移に血小板が関与する可能性についても様々な報告がなされている。がん患者において血小板増加が

みられること、血栓症発症が頻発すること、さらにはがん転移による症状の進行した患者において血小板活性化の亢進が認められることなどから腫瘍細胞と血小板の両者には関連があり、血小板ががん転移に重要な役割を担う可能性が示唆されている^(3,26)。

血小板によるがん転移のメカニズムとして、腫瘍細胞の添加により血小板凝集能が惹起されることが重要であるという報告がある^(4,5,27,28)。本研究においても過去の報告と同様に腫瘍細胞 B16/BL6 細胞株や colon-26 細胞株添加により血小板凝集は惹起された (図 6-A, B)。しかし、過去の報告では、この血小板凝集が腫瘍細胞から放出される液性因子または腫瘍細胞により活性化された血小板から放出される顆粒因子によるものであるか、それとも腫瘍細胞と血小板が接着することによるものなのかは未だ明らかになっていない。

そこで、本研究では、腫瘍細胞に血小板が接着するか否かを検討した。B16/BL6 細胞株は、血小板膜表面マーカーである CD41 を発現していないが、血小板の添加により抗 CD41 抗体への反応が陽性となったことから (図 5)、腫瘍細胞表面に血小板が接着している可能性が示唆され (図 7)、腫瘍細胞添加による血小板凝集の惹起は腫瘍細胞と血小板の

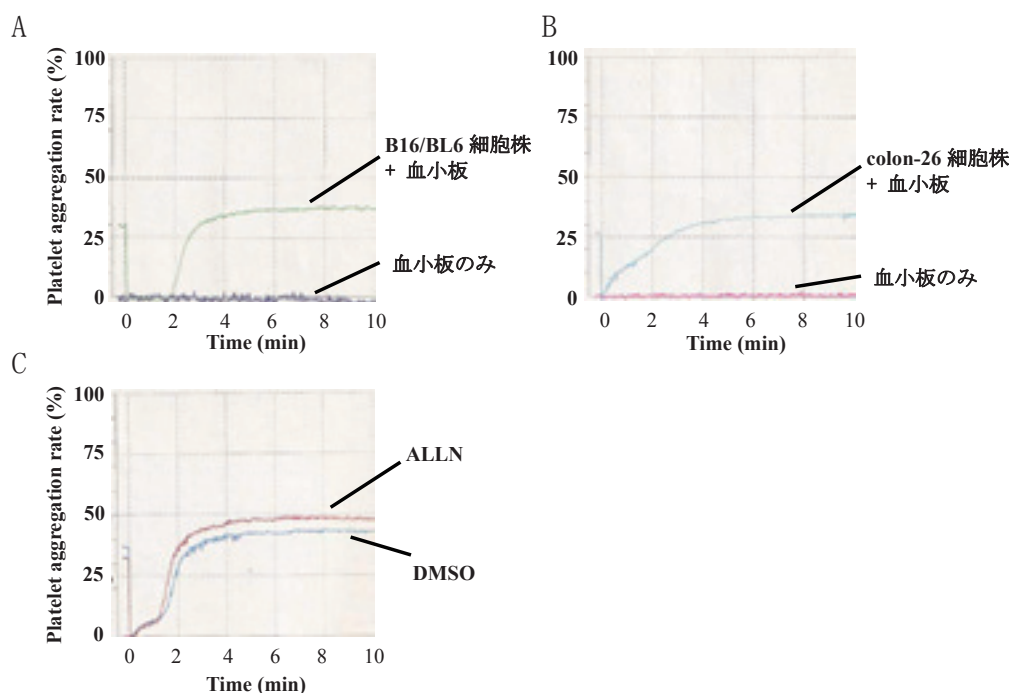


図 6. 腫瘍細胞による血小板凝集の惹起

A, B: 血小板浮遊液に B16/BL6 細胞株 (A) および colon-26 細胞株 (B) を添加し、血小板凝集能を測定した。
C: calpain 阻害剤、ALLN を添加した血小板浮遊液に B16/BL6 細胞株を添加し、血小板凝集能を測定した。

接着が原因であると考えられる。近年、血小板膜上の CLEC-2 が、がん細胞に発現する podoplanin の受容体であること、さらに podoplanin が CLEC-2 と結合することにより血小板凝集が惹起されることが明らかとなった^(7,8)。従って、本研究における腫瘍細胞による血小板凝集は、細胞同士の接着、特に腫瘍細胞上の podoplanin と血小板上の CLEC-2 の結合を介して惹起されたのかもしれない。一方、抗 podoplanin 抗体や抗 CLEC-2 抗体の投与により podoplanin 発現腫瘍細胞の肺転移が抑制されたという報告もあり^(7,8)、podoplanin と CLEC-2 の結合が腫瘍細胞と血小板の接着のみならず、がん転移、特に腫瘍細胞の脈管内での移動および転移臓器の血管内皮への接着に極めて重要であると考えられる。

がん転移の過程における腫瘍細胞の分子メカニズムについては様々な細胞内情報伝達物質の関与が報告されており、なかでも calpain は近年注目を集めているが^(10,25)、がん転移への直接的な関与については報告がほとんどない。そこで、腫瘍細胞によって惹起される血小板凝集への calpain の関与について calpain 阻害剤を添加し検討したが、影響はみられなかったことから (図 6-C)、腫瘍細胞による血小

板凝集に calpain は関与しないと考えられる。

一方、用いた 2 種の細胞株に calpain 阻害剤を添加し、腫瘍細胞の遊走や浸潤を評価したところ、共に有意に低下したことから (図 2-4)、calpain はがん転移の重要なステップである遊走や浸潤に関与している可能性が示唆された (図 7)。がん細胞において calpain が遊走に関与するという報告はこれまでに存在しないものの、Huttenlocher らは、calpain 阻害剤添加により Chinese hamster ovary (CHO) 細胞の遊走能が低下すること、また calpain 発現を低下させた CHO 細胞においても遊走能の低下が認められることを示し、calpain は細胞遊走に関与することを明らかにした⁽²⁹⁾。一方、Noma らは calpain 阻害剤により単球の遊走能が上昇すること、つまり calpain は細胞遊走を抑制する役割を担う可能性を報告した⁽³⁰⁾。このように、細胞の遊走における calpain の役割においては統一した見解が存在しないのが現状である。従って、がん転移における calpain の関与については、細胞種の違いのみならず、遺伝子導入の有無、正常細胞とがん化した細胞の間でシグナル伝達系に差がある可能性などが考えられる。

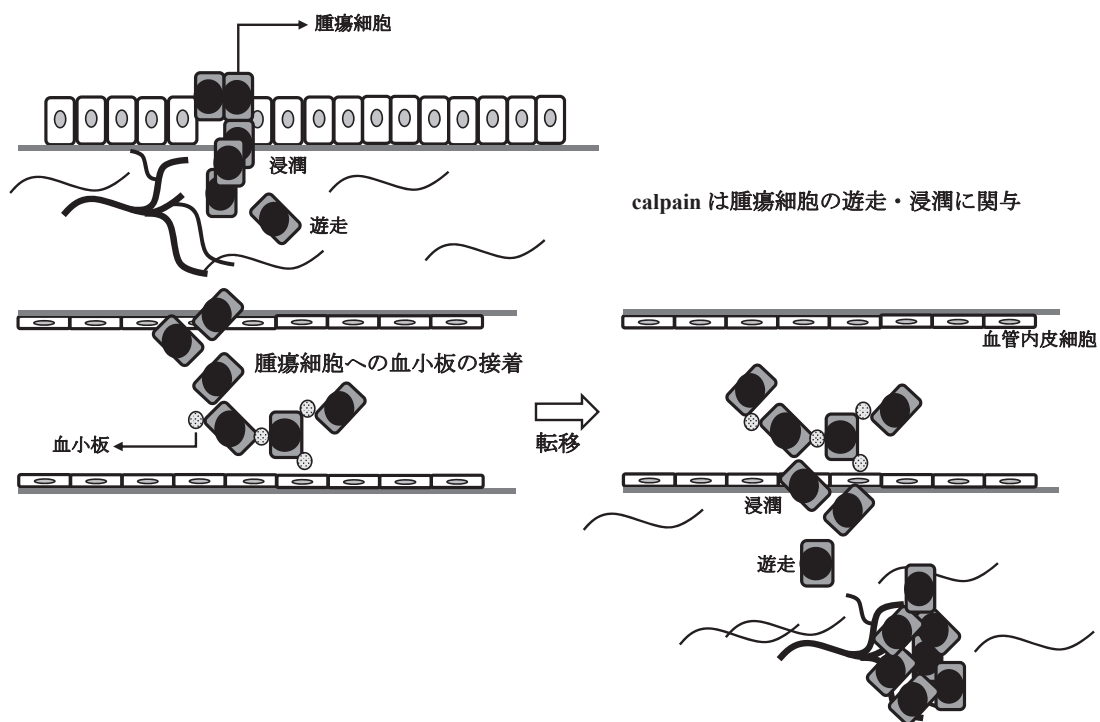


図 7. 腫瘍細胞の浸潤および遊走における calpain の関与

calpain は腫瘍細胞の浸潤および遊走に関与する。さらに腫瘍細胞と血小板の接着は、腫瘍細胞の転移、特に血管内皮細胞への接着に重要な役割を担う可能性がある。

また本研究では、腫瘍細胞の遊走のみならず浸潤においても calpain が関与する可能性が明らかとなった。がん細胞が浸潤する際には、MMP が細胞周囲の細胞外基質を分解することや MMP-2 (gelatinase A) 欠損マウスに B16/BL6細胞株を移植すると腫瘍の増殖が抑制されることが知られている⁽³¹⁾。しかしながら、正常血管内皮細胞においては、fluid shear stress と sphingosine 1-phosphate が calpain 活性化を通して membrane type 1 (MT1)-MMP の膜への移行を促進させるという MMP と calpain の相互作用を示した報告も存在する⁽³²⁾。また、prostacyclin (PGI₂) や抗血小板製剤である cilostazol などの使用により MMP-9 の分泌が低下し、その結果として腫瘍細胞の侵襲性が阻害される可能性やがん患者への aspirin の使用が患者の生存を延長させることも報告されていることから⁽³³⁻³⁶⁾、今後はがん細胞と血小板、そして MMP 活性と calpain の関与についてもより詳細に検討することが必要である。

V 結語

calpain はがん転移、特に腫瘍細胞の遊走および浸潤を制御する重要な分子であることが示唆された。しかしながら、遊走および浸潤の際に活性化した calpain の基質は何であるのか、calpain の下流のシグナル経路がどのようになっているのかなどいくつかの問題点は残っており、今後より詳細な検討が必要であると思われる。

文献

- 1) Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC: Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 61: 46-52, 1968.
- 2) Nierodzik ML, Klepfish A, Karpatkin S: Role of platelet, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. *Thromb Haemost*, 74: 282-290, 1995.
- 3) Sierko E, Wojtukiewicz MZ: Platelets and angiogenesis in malignancy. *Semin Thromb Hemost*, 30: 95-108, 2004.
- 4) Mehta P, Lawson D, Ward MB, et al: Effect of

- human tumor cells on platelet aggregation: potential relevance to pattern of metastasis. *Cancer Res*, 47: 3115-3117, 1987.
- 5) Mehta P, Lawson D, Ward MB, et al: Effect of thromboxane A2 inhibition on osteogenic sarcoma cell-induced platelet aggregation. *Cancer Res*, 46: 5061-5063, 1986.
 - 6) Kaneko M, Kato Y, Kunita A, et al: Functional sialylated O-glycan to platelet aggregation on Aggrus (T1alpha/Podoplanin) molecules expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 279: 38838-38843, 2004.
 - 7) Suzuki-Inoue K, Fuller GL, García A, et al: A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood*, 107: 542-549, 2006.
 - 8) Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, 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.
 - 9) Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, 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.
 - 10) Shirai T, Inoue O, Hirayama K, et al: CLEC-2 facilitates hematogenous tumor metastasis and in vitro tumor growth, but not in vivo tumor growth. *J Thromb Haemost*, 13: 226, 2015.
 - 11) Meng XN, Jin Y, Yu Y, et al: Characterisation of fibronectin-mediated FAK signaling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*, 101: 327-334, 2009.
 - 12) Guroff G, Guroff G: A neutral calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem*, 239: 149-155, 1964.
 - 13) Sorimachi H, Suzuki K: The structure of calpain. *J Biochem*, 129: 653-664, 2001.
 - 14) Sakon M, Kambayashi J, Ohno H, et al: Two forms of Ca²⁺-activated neutral protease in platelets. *Thromb Res*, 24: 207-214, 1981.
 - 15) Schoenwaelder SM, Kulkarni S, Salem HH, et al: Distinct substrate specificities and

- functional roles for the 78- and 76-kDa forms of μ -calpain in human platelets. *J Biol Chem*, 272: 24876-24884, 1997.
- 16) Rock MT, Dix AR, Brooks WH, et al: Beta1-integrin-mediated T-cell adhesion and cell spreading are regulated by calpain. *Exp Cell res*, 261: 260-270, 2000.
 - 17) Potter DA, Tirnauer JS, Janssen R, et al: Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol*, 141: 647-662, 1998.
 - 18) Kulkarni S, Saido TC, Suzuki K, et al: Calpain mediates integrin-induced signaling at a point upstream of Rho family members. *J Biol Chem*, 274: 21265-21275, 1999.
 - 19) Fox JE: On the role of calpain and Rho proteins in regulating integrin-induced signaling. *Thromb Haemost*, 82: 385-391, 1999.
 - 20) Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, et al: Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 276: 48382-48388, 2001.
 - 21) Bialkowska K, Kulkarni S, Du X, et al: Evidence that beta3-integrin-induced Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active. *J Cell Biol*, 151: 685-696, 2000.
 - 22) Yoshida H, Murachi T, Tsukahara I: Degradation of actin and vimentin by calpain II, a Ca^{2+} -dependent cysteine proteinase, in bovine lens. *FEBS Lett*, 170: 259-262, 1984.
 - 23) Blomgren K, Zhu C, Wang X, et al: Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia. *J Biol Chem*, 276: 10191-10198, 2001.
 - 24) Howe AK: Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta*, 1692: 159-174, 2004.
 - 25) Martín-Villar E, Yurrita MM, Fernandez-Munoz B, et al: Regulation of podoplanin/PA2.26 antigen expression in tumour cells. Involvement of calpain-mediated proteolysis. *Int J Biochem Cell Biol*, 41: 1421-1429, 2009.
 - 26) Khorana AA, Francis CW, Culakova E, et al: Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. *Cancer*, 104: 2822-2829, 2005.
 - 27) Mahalingam M, Ugen KE, Kao KJ, et al: Functional role of platelets in experimental metastasis studied with cloned murine fibrosarcoma cell variants. *Cancer Res*, 88: 1460-1464, 1988.
 - 28) Okoshi H, Hakomori S, Nisar M, et al: Cell membrane signaling as target in cancer therapy II: Inhibitory effect of *N, N, N*-trimethylsphingosine on metastatic potential of murine B16 melanoma cell line through blocking of tumor cell-dependent platelet aggregation. *Cancer Res*, 51: 6019-6024, 1991.
 - 29) Huttenlocher A, Palecek SP, Lu Q, et al: Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem*, 272: 32719-32722, 1997.
 - 30) Noma H, Kato T, Fujita H, et al: Calpain inhibition induces activation of the distinct signaling pathway and cell migration in human monocytes. *Immunology*, 128: e487-e496, 2009.
 - 31) Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, et al: Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*, 58: 1048-1051, 1998.
 - 32) Kang H, Kwak HI, Kaunas R, et al: Fluid shear stress and sphingosine1-phosphate activate calpain to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) membrane translocation and endothelial invasion into three-dimensional collagen matrices. *J Biol Chem*, 286: 42017-42026, 2011.
 - 33) Suzuki K, Aiura K, Ueda M, et al: The influence of platelets on the promotion of invasion by tumor cells and inhibition by antiplatelet agents. *Pancreas*, 29: 132-140, 2004.
 - 34) Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, et al: Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet*, 376: 1741-1750, 2010.

35) Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, et al:
Effect of daily aspirin on long-term risk of
death due to cancer: analysis of individual
patient data from randomised trials. *Lancet*,
377: 31-41, 2011.

36) Rothwell PM, Price JF, Fowkes FG, et al:

Short-term effects of daily aspirin on cancer
incidence, mortality, and non-vascular death:
analysis of the time course of risks and
benefits in 51 randomised controlled trials.
Lancet, 379: 1602-1612, 2012.

(平成30年12月2日受理)

Calpain is involved in tumor cell migration and invasion in cancer metastasis but not tumor cell-induced platelet aggregation.

Yukinori KOZUMA, Yuko TASHIRO, Ipppei NOBORUO, Haruhiko NIOMIYA

Abstract

Background: Metastasis is the major cause of cancer death. Although interactions between tumor cells and platelets have been suggested to regulate cancer metastasis, the molecules associated with the tumor cell-induced platelet activation have not been identified. Ca^{2+} -dependent cysteine protease, calpain, has been known as a regulator of cell motility and cell migration. It is not known, however, whether calpain is involved in tumor cell migration and invasion in cancer metastasis. In the present study, we examined the role of calpain in cancer metastasis. Methods: The metastasis function was assessed by using migration, wound healing and invasion assays in the presence of calpain inhibitor. In addition, we assayed the effects of tumor cells on murine platelet aggregation. Results: Migration and invasion of B16/BL6 melanoma cells and colon-26 colon cancer cells were significantly inhibited by the addition of calpain inhibitor, ALLN. Similarly, these inhibitions were also shown by using different calpain inhibitors, EST, PD150606 and calpastatin peptide. Furthermore, platelet aggregation was induced by the addition of tumor cells. However, the treatment of ALLN failed to suppress platelet aggregation by tumor cells. Conclusion: We demonstrated that calpain is involved in tumor cell migration and invasion but not tumor cell-induced platelet aggregation.