

## 論文の内容の要旨

論文題目 Characterization of fibroblast growth factor receptor-binding DNA aptamer and its biological applications

(繊維芽細胞増殖因子受容体に結合するDNAアプタマーの解析とその生物学的応用)

氏 名 江口 晃弘

### 第1章：緒言

繊維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) は繊維芽細胞増殖因子 (FGF) の結合により二量体化し活性化する。FGFR の二量体化は細胞内のチロシンキナーゼドメインを近接させ、その結果として自己リン酸化が起きる。このリン酸化により下流のシグナル伝達タンパク質のリクルートと活性化が誘導され、増殖・遊走・分化など様々な細胞機能が誘導される。FGFR は4つのファミリーメンバー (FGFR1-4) から構成され、FGF は22のファミリーメンバー (FGF1-14, FGF16-23) から構成される。FGFR の細胞外ドメインは3つの免疫グロブリン様ドメイン (Ig-like domain I-III) が繋がった構造をしており、FGFR1-3 は Ig-like domain III が異なるエクソンによってコードされた IIIb と IIIc と呼ばれる2つのスプライシング変異体を持つ。

FGFR は様々ながんにおいて過剰発現や変異が見られるがん関連遺伝子でもある<sup>2-4</sup>。FGFR の1つである FGFR2b は、ヒト胃がん細胞株 KATO-III において初めて増幅が確認されたがん関連タンパク質であり、胃がんにおいては4-9%の症例において FGFR2b の増幅が見られることが知られている<sup>2-4</sup>。FGFR ファミリーメンバーはそれぞれ特異的な機能を発揮するため、FGFR2b のみを特異的に標的化することが FGFR2b 関連のがん治療において極めて重要である。これまでに多くの FGFR に対するチロシンキナーゼ阻害剤が開発されているが<sup>6</sup>、これらの薬剤は FGFR のキナーゼドメインの構造的な類似性に起因する特異性の低下により、他の FGFR ファミリーメンバーを阻害してしまう問題がある。このため FGFR2b 特異的な阻害剤の開発には大きな関心が寄せられている。

DNA アプタマーは抗体と同等の高い親和性や特異性で標的に結合する分子であり、熱的に安定であることや化学合成可能であること等の様々な利点を有することから抗体の代替物として注目されている<sup>7</sup>。本研究では FGFR2b 結合性 DNA アプタマーの取得を行い、その FGFR2b 過剰発現がんでの FGFR2b シグナルに対する作用に関する研究を行った。

### 第2章：FGFR2b 結合性 DNA アプタマーの取得および評価

本章では FGFR2b 結合性 DNA アプタマーの取得を行い、アプタマーの構造および FGFR2b に対する結合特性の評価を行った。はじめに SELEX 法により FGFR2b 結合性 DNA アプタマーの取得を行い、76塩基からなる FGFR2b 結合性 DNA アプタマー”Apt\_76”を同定した。次に、Apt\_76 配列中で結合に関与する最小配列

の特定を目指した。短鎖化した Apt\_76 に関して FGFR2b への結合の評価を行った結果、Apt\_76 内の 46 塩基からなるアプタマー”Apt\_46”が FGFR2b への結合能を示す最小構造であることが確認された。これより、以後の研究においては Apt\_46 を FGFR2b 結合性 DNA アプタマーとして用いることとした。

Apt\_46 の FGFR ファミリー内における結合特異性の評価を行った結果、FGF1 が全ての FGFR に結合するのに対し、Apt\_46 は FGFR2b にのみ結合することが確認された。結合親和性の測定は等温滴定型カロリメトリーにより行い、解離定数は  $79.7 \pm 16.7$  nM であった。滴定曲線からは大きなエンタルピーの獲得 ( $\Delta H = -20.2 \pm 0.5$  kcal/mol) が確認され、水素結合や静電相互作用の形成が示唆された。これらの相互作用が FGFR2b に対する特異的な結合に寄与していると考えられる。

### 第 3 章：Apt\_46 の FGFR2b 発現細胞株への作用

本章では、Apt\_46 が細胞膜上に発現する FGFR2b に及ぼす作用を評価した。はじめに Apt\_46 の細胞培養環境中での安定性を評価した。その結果、Apt\_46 は 10%ウシ胎児血清中で徐々に分解するものの、3'末端の inverted dT 修飾を行うことで安定性が向上することが示された。次に細胞上に発現した FGFR2b への結合能評価を行い、Apt\_46 が FGFR2b 陽性細胞株へ選択的に結合することを確認した。

Apt\_46 のエピトープに関する知見を得るため、FGFR2b の天然リガンド FGF10 に対する結合競合アッセイを行なった。その結果、Apt\_46 の濃度依存的な FGF10 の結合量低下が見られ、Apt\_46 と FGF10 のエピトープが部分的に重なっていることが示唆された。FGF10 のエピトープが FGFR2b の Ig-like domain II および III にまたがること、および Apt\_46 は Ig-like domain III のスプライシング変異体 FGFR2c には結合しないという事実から、Apt\_46 のエピトープは Ig-like domain III 周辺と想定される。Apt\_46 が FGFR2b の天然リガンドである FGF10 と競合することから、そのアンタゴニスト活性を確認した。その結果、Apt\_46 は FGF リガンドによって増強される FGFR2b のリン酸化を阻害した。

### 第 4 章：Apt\_46 による FGFR2b シグナル阻害効果およびその作用機序の解明

本章では、がん細胞における FGFR2b の内因性活性化に対する Apt\_46 の阻害効果と阻害機構の解析を行った。FGFR2b 過剰発現がん細胞株である SNU16 および KATO-III ではリガンド非添加条件においても FGFR2b のリン酸化が生じる。この細胞に Apt\_46 を添加したところ、この内在的なリン酸化が阻害されることが確認された。FGFR はリガンド非存在下においても二量体を形成することが報告されていることから、Apt\_46 の FGFR2b の内因性活性化に対する阻害作用は、リガンド非依存的な二量体形成の阻害によるものであると仮説を立てた。そこで SNU16 細胞上における FGFR2b の二量体状態をタンパク質の架橋反応を利用して調べた。リガンド非添加条件において、クロスリンカーの添加依存的により FGFR2b 単量体由来ではない新たなバンドが高分子側に確認され、リガンド非依存的な二量体の形成が示唆された。Apt\_46 の添加により高分子側のバンドの強度が減少することが確認され、Apt\_46 が FGFR2b のリガンド非依存的な二量体の形成を阻害する可能性が示唆された。

Apt\_46 による阻害効果を詳細に解析する為、FGFR2b の細胞内ドメインの各リン酸化修飾部位の修飾状態を、LC-MS/MS を用いたラベルフリー定量解析を用いて評価した。FGFR2b 細胞内ドメインの被リン酸化サイトのうち、Y586/Y588、Y656/Y657、および S780 の 3 サイトが定量検出された。3 サイト全てにおいてリン酸化量の減少が見られ、Apt\_46 が FGFR2b のチロシンキナーゼ活性及びそれによる細胞内ドメインの自己リン酸化を阻害することが示唆された。また FGFR2b の下流シグナルタンパク質である Akt 及び Erk のリン酸化が Apt\_46 の濃度依存的に阻害されることが確認された。

Apt\_46 の阻害機能の特異性を評価する為、FGFR3 依存性細胞株 KMS11 に対して Apt\_46 を作用させ阻害効果の評価を行った。KMS11 では FGFR3 が過剰発現しリガンド非存在下で活性化している。Apt\_46 を KMS11 に添加した際には FGFR3 活性化への阻害効果は認められなかった。また、SNU16 および KMS11 を Apt\_46 存在下で培養し細胞生存率を測定したところ、SNU16 においてのみ細胞増殖が抑制されることが確認され、Apt\_46 が FGFR2b の内因性活性化を特異的に阻害していることが示唆された。

Apt\_46 の FGFR2b への高い結合特異性を考慮すると、FGFR2b 過剰発現がん細胞に対しより選択的に作用すると期待される。実際、Apt\_46 と AZD4547 をそれぞれ投与した際の FGFR2b 発現細胞のリン酸化プロテオーム変化を解析すると、リン酸化の増減度合いが異なるタンパク質が複数確認された。この結果は AZD4547 が細胞内のチロシンキナーゼにも作用しうる一方で、Apt\_46 の阻害作用が細胞表層の FGFR2b 特異的に働くという違いにより説明されうる。

## 第 5 章：結言

本研究では、FGFR2b 結合性 DNA アプタマー”Apt\_46”の開発、及びその FGFR2b 過剰発現がん細胞株に与える影響に関して研究を行い、Apt\_46 が FGFR2b へ特異的に結合し、その活性化を阻害することを明らかにした。FGFR はがん治療における重要な標的であるが、チロシンキナーゼ阻害剤の特異性の低さが問題となっている。Apt\_46 が FGFR2b に高い選択性で結合することは、副作用の低減が必須である治療薬としての応用に際して大きな利点である。

また、Apt\_46 は増殖因子受容体のリガンド非依存的な二量化を阻害することが示唆された。受容体に対してアンタゴニスト活性を示す DNA アプタマーの報告は複数あるが、アプタマーがリガンド非依存的な増殖因子受容体の二量化を阻害することはこれまでに実証されていない。現在の実験デザインでは SNU-16 や KATO-III における異常な FGFR2b 活性化がオートクリン型で起こっている可能性を完全には排除できないことに留意すべきであるが、本研究はリガンド非依存的な受容体二量化を阻害する DNA アプタマーを提唱するものであり、今後この作用の構造基盤を明らかにすることで二量化受容体を標的とした阻害剤設計指針確立の一助となる。