

審査の結果の要旨

氏名 江口 晃弘

本学位請求論文「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」は、がん関連遺伝子の一つである繊維芽細胞増殖因子受容体 (fibroblast growth factor receptor: FGFR) に結合し、その活性を制御する新規化学抗体 (アプタマー) の開発と応用に関する論文である。

第一章では、FGFR の生理作用とがん関連遺伝子としての特性について概説し、FGFR 選択的阻害剤開発の重要性について述べている。FGFR は 4 つのファミリーメンバー (FGFR1-4) から構成され、その一種である FGFR2b は胃がん、肺がんなどのがん細胞株において過剰発現することが報告されている。これまでに、FGFR 阻害剤として機能する小分子化合物のがん治療への応用が検討されてきたが、FGFR のキナーゼドメインはファミリー間、または他種の増殖因子受容体との間に高い相同性を持つため、標的以外の受容体を阻害することによる副作用が指摘されている。この点に着目した本著者は、高い熱安定性を持ち化学合成可能な化学抗体として知られる DNA アプタマーからなる FGFR2b 選択的阻害剤の開発を志向し、その FGFR2b 過剰発現がんに対する阻害効果と作用機序を明らかにすることを本論文の目的として述べている。

第二章では、FGFR2b 結合性 DNA アプタマーの取得、および、その結合特性と構造の評価について述べている。試験管内進化法によって FGFR2b に結合する DNA 配列を特定し、短鎖化によって 46 塩基の FGFR2b 結合アプタマー、Apt_46 の取得に成功した。等温滴定型カロリメトリーによる解析から、Apt_46 の FGFR2b への結合はエンタルピー駆動型のプロファイルを示し、解離定数は約 80 nM と計測された。FGFR ファミリーに対する親和性評価を実施したところ、Apt_46 は FGFR2b に対する高い選択性を示すことが示された。また、アガロースゲル電気泳動と円偏光二色性スペクトル測定による解析から、Apt_46 がアプタマーに特徴的な構造モチーフの一つである、グアニン四重鎖 (G4) 構造を形成しており、このモチーフが FGFR2b への結合に寄与していることが示唆された。これらの結果から、Apt_46 は特徴的な G4 構造を形成し、その結果 FGFR2b に対する特異的な結合特性を示すと結論付けている。

第三章では、Apt_46 の生化学的な応用可能性の検証について述べている。DNA アプタマーの細胞培養環境中、または生体環境中での応用においては DNA 分解酵素への耐性が重要となる。評価の結果、Apt_46 は血清中で DNA 分解酵素による分解を受けることが示唆されたが、3'末端の inverted dT 修飾により、分解耐性が大幅に向上することが示された。次に、FGFR2b 過剰発現細胞株 (SNU16、KATO-III) および非発現細胞株 (KMS11) を用いて、細胞膜上に発現する FGFR2b への結合を確認したところ、Apt_46 の FGFR2b 過剰発現細胞株への選択的な結合が確認された。また、FGFR2b の天然リガンドである FGF10 との競合アッセイの結果から Apt_46 のエピトープは、FGF10 のエピトープと部分的に重なることが示唆され、FGFR2b の Ig-like domain III 近傍にあると推測された。この結果と一致して、Apt_46 は FGF10 依存的な FGFR2b 活性化を阻害する競合的アンタゴニストとして機能することが見出された。

第四章では、Apt_46 が示すユニークな FGFR2b の阻害効果について、その細胞シグナル伝達への影響と阻害機構の解析について述べている。Apt_46 は FGFR2b 過剰発現細胞で見られる、恒常的な FGFR2b 活性化を阻害する作用をもつことが示された。その作用機序の断定には至っていないものの、化学的架橋剤を用いた解析から、Apt_46 は FGFR2b 過剰発現細胞で生じる FGFR2b の自発的な二量化形成を阻害することで恒常的な FGFR2b 活性化を阻害している可能性が示唆された。また Apt_46 存在下で FGFR2b 過剰発現細胞を培養したところ、ERK や AKT などの FGFR2b の下流シグナル分子のリン酸化阻害が確認された。また、リン酸化プロテオーム解析により作用機序に関する考察を行っている。これらの結果から、Apt_46 の FGFR2b 依存的がん細胞阻害剤としての応用可能性を述べている。

第五章では、本研究内容のまとめが述べられた後、受容体と選択的に相互作用するアプタマーを用いた阻害剤開発、受容体研究に対する今後の展望について述べられている。

上記の通り、本学位論文ではがん関連遺伝子の一つである FGFR2b の恒常的活性化に対するユニークな阻害作用を示す化学抗体の開発、およびその生理作用についての解析を報告している。恒常的な増殖因子受容体の活性化を抑制する選択的阻害剤の開発例は、一般的な小分子チロシンキナーゼ阻害剤と比較して報告例が非常に少なく、その分子基盤の解明やがん細胞におけるシグナル伝達への影響の解析は、今後の阻害剤開発に対し重要な知見を与えると期待され、本論文の学術的価値は高い。上記の理由から、博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。