

審査の結果の要旨

氏名 由井 杏奈

本論文は 5 章より構成されている。第 1 章は本論文の序論である。Liver Intestine-cadherin (LI-cadherin)は胃がんや大腸がん、すい臓がんなど多くの種類のがん細胞上で発現することが確認されている。LI-cadherin の発現ががん細胞の増殖を促進する例がある一方で、LI-cadherin の発現によって逆にがんの転移が抑制されるとの報告もあり、LI-cadherin はがんの治療標的として注目を集めている。また、胃の正常細胞には発現しないものの、胃がん細胞において高い確率で発現していることから、胃がんの高感度イメージングに向けた標的としても注目されている。しかし、LI-cadherin の分子としての性質はほとんど明らかになっておらず、これまでに LI-cadherin を標的とした医薬品の開発には至っていなかった。以上に基づき、本研究の主旨である、LI-cadherin の性質の分子レベルでの記述に向けた解析、その解析結果をもとにした、エピトープの異なる抗 LI-cadherin 抗体を用いた LI-cadherin 依存的な細胞接着を阻害・促進したメカニズムの提案、さらに LI-cadherin 遺伝子上の一塩基多型(SNP)に伴うアミノ酸変異による、大腸がんのリンパ節転移のリスクが上昇した分子メカニズムの提案に関して議論されている。

第 2 章には、LI-cadherin の性質を分子レベルで解析した結果が記述されている。Cadherin による細胞接着は一般的に、異なる細胞上に発現する同種の cadherin 同士のホモ二量体形成によって行われる。本研究において、LI-cadherin の細胞外部位部分長である EC1-4 のホモ二量体の結晶構造の取得に成功し、二量体の形状が他種の cadherin とは異なることが示された。さらに、結晶構造を用いて行った分子動力学(MD)シミュレーションによって、LI-cadherin が持つカルシウムイオンが結合しない特殊なリンカーが、二量体非形成時に大きな柔軟性を持つことが明らかとなった。また、変異体解析によって二量体の形成を大きく阻害する変異の特定に成功した。その変異を導入した LI-cadherin を発現する CHO 細胞株を樹立し、LI-cadherin の野生型を発現する CHO 細胞との細胞凝集能を細胞凝集アッセイによって比較することにより、結晶構造が得られた二量体の形成によって、LI-cadherin 依存的な細胞接着が行われることが示された。本研究により、これまで未知であった LI-cadherin の分子レベルの性質について多くの知見が得られた。

第 3 章には、エピトープが異なる 5 種類の抗 LI-cadherin 抗体を用いた解析結果が示されている。第 2 章でも行われた細胞凝集アッセイの際に各抗体を添加し、各抗体の細胞凝集阻害能や、細胞凝集体破壊能の有無の評価が行われた。その結果、細胞凝集体を破壊する

抗体や、逆にサイズの大きい凝集体を多数形成させる抗体などがあり、各抗体が様々な性質を示し、それぞれが LI-cadherin を標的としたがん治療に応用できる可能性が示唆された。本論文においては各抗体のエピトープ解析の結果及び、第 2 章で述べられた二量体の構造等の知見と合わせて、各抗体が細胞接着を阻害または促進したメカニズムについて、考察が行われている。今後臨床サンプルを用いた解析も合わせて行うことにより、LI-cadherin を発現するがんの治療やイメージングにおいて利用可能な抗体を開発できると期待される。

第 4 章では、LI-cadherin 遺伝子上の 2 ヶ所の SNP に伴う 2 つのアミノ酸変異によって、大腸がんのリンパ節転移のリスクが上昇する分子メカニズムの解析結果が述べられている。2 ヶ所の SNP に伴い、Lys115 が Glu に、Glu739 が Ala に置換される。第 2 章で示した EC1-4 が形成する二量体に対するアミノ酸変異の影響を評価するために、EC1-4 の Lys115 を Glu に置換した変異体 EC1-4K115E の二量体の解離定数の測定が行われた。その結果、変異によって二量体形成能が低下することが示された。MD シミュレーションにより、115 番目の残基に関わる相互作用の変化によってドメイン同士の角度が変化したことが、親和性の低下に繋がったことが示された。また、細胞凝集アッセイにより、双方のアミノ酸変異が細胞凝集能を低下させることが明らかとなった。これらの結果より、SNP に伴うアミノ酸変異により LI-cadherin の二量体の親和性が減少し、LI-cadherin 依存的な細胞接着の強度が低下したことで、細胞が他の部位へ移動しやすくなったことが、転移リスクの上昇に繋がったことが示唆された。本研究はがん細胞上での LI-cadherin の役割について、分子レベルで議論した初めての例となった。

第 5 章には本論文の総括と今後の展望が示されている。本研究においては、*in vitro* と *in silico* の手法を効果的に用いることにより、LI-cadherin が他種の cadherin とは異なる二量体形成機構を示すことなど、これまで理解が進んでいなかった LI-cadherin の分子としての性質の記述に成功した。これらの解析結果は今後 LI-cadherin を標的とした医薬品の開発に大きく貢献すると考えられる。実際に本研究において、抗 LI-cadherin 抗体が LI-cadherin 依存的な細胞接着に与えた影響のメカニズムや、LI-cadherin のアミノ酸変異によって大腸がんの転移リスクが上昇したメカニズムは、第 2 章で示された結果が基盤となり詳述できている。LI-cadherin は多くのがん細胞上で発現が確認されており、本研究で得られた知見を活用することで、様々ながんに対する医薬品等の開発に貢献することが期待される。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。