

## 審査の結果の要旨

氏名 工藤 翔太

細胞接着蛋白質である **P-cadherin** は正常組織における発現量は低い一方、膵臓癌、肺癌等の難知性の癌で特異的に高発現することが知られている。さらに、**P-cadherin** は癌細胞の増殖能の増加、浸潤能、転移能の増強といった癌の悪性化機構にも寄与していることが知られている。また、抗体分子を用いた **P-cadherin** の細胞接着阻害には、癌細胞の悪性化を抑制する働きがあることも近年分かってきた。以上のことから、**P-cadherin** は癌治療、診断の標的分子として期待でき、**P-cadherin** の細胞接着阻害は治療戦略として有望であると考えることができる。しかしながら、抗体分子による **P-cadherin** の細胞接着阻害機構は未だに解明されていない。阻害機構の解明は、新たな阻害抗体分子の設計に応用でき、癌治療等の医療へ貢献するものと期待できる。

本論文では、**P-cadherin** の細胞接着を阻害する抗体の合理的設計方針を提唱することを最終目的としている。最終目的達成のために、抗原の理解として「**P-cadherin** による細胞接着機構の解明」、抗体の理解として「抗 **P-cadherin** 抗体による細胞接着阻害機構の解明」を行っている。本論文は 4 章から構成されており、1 章では **P-cadherin** を標的とした癌治療の重要性や課題、研究目的が述べられている。2 章では抗原 **P-cadherin** の機能解析、3 章では抗 **P-cadherin** 抗体の機能解析について述べられている。4 章では、2 章、3 章の解析結果に基づいて、**P-cadherin** の細胞接着阻害抗体の合理的な設計方針が考察されている。

2 章では、**P-cadherin** による細胞接着機構が説明されている。最初に **P-cadherin** を発現する CHO 細胞株を樹立し、免疫染色法と Cell aggregation 法により細胞接着機能を確認した。その後、**P-cadherin** がどのような homo-dimer を形成し、どのように細胞同士を結びつけているのか解明するために、**P-cadherin** のドメイン蛋白質を設計した。EC12 は Asp から始まる成熟型の N 末端を保有し、EC1 と EC2 の 2 ドメインから構成されるドメイン蛋白質である。MEC12 は Asp の前に Met を付加した変異体である。EC12 と MEC12 の結晶構造解析より、EC12 は Strand-swap dimer を形成し、MEC12 は X-dimer

と呼ばれる別の homo-dimer を形成することが分かった。さらに、両 dimer の関係を解明するために X-dimer を特異的に阻害する変異(K14E、Q101L)を同定した。EC12に K14E や Q101L の変異を導入すると、Strand-swap dimer の形成速度が顕著に低下することが明らかになった。X-dimer の阻害により細胞接着機能も低下することから、X-dimer は Strand-swap dimer 形成を促進する速度論的な中間体として機能していることが示唆された。さらに、超遠心分析の結果、X-dimer は熱力学的な観点からも、Monomer と Strand-swap dimer の中間体として存在することが分かった。また、MEC12 変異体の結晶構造解析により、X-dimer は Strand-swap dimer 形成に必須である、Trp2 の構造変化を触媒することで Strand-swap dimer 形成を促進していることが分かった。X-dimer は特殊な疎水環境を形成することで、Trp2 を含む疎水性 $\beta$ -strand の swapping 反応を触媒していることが分かった。以上の結果から、X-dimer が自己の構造変化を触媒する「Self-Chaperone」として機能することで、P-cadherin の細胞接着形成が迅速かつ特異的に達成されていると結論づけられた。

3 章では、抗 P-cadherin 抗体による細胞接着阻害機構が説明されている。TSP5、TSP7、TSP11 の 3 種の抗体を一本鎖抗体(scFv)として大腸菌 BL21(DE3)により発現させ、封入体から巻き戻し法により調製を行った。SPR を用いた相互作用解析の結果、3 種の抗体は同等の親和性で( $K_D \approx 10$  nM)P-cadherin の EC1 を認識することが明らかになった。P-cadherin を発現する CHO 細胞株を用いた免疫染色と Cell aggregation assay の結果、TSP7 のみが強い細胞接着阻害能を保持することが明らかになった。また、エピトープマッピングの結果、3 種の抗体のエピトープは EC1 の中でも異なっており、TSP7 の認識するエピトープが細胞接着阻害において重要である可能性が示唆された。さらに、サイズ排除クロマトグラフィーによる解析の結果、TSP7 は Strand-swap dimer と X-dimer の両方を阻害する働きがあることが分かった。Strand-swap dimer のみを阻害する TSP11 には強い接着阻害能が観られなかったことから、X-dimer の阻害が、細胞接着阻害において非常に重要であることが分かった。TSP7 による dimer 阻害機構を解明するために、TSP7 と MEC1 の共結晶構造解析を行った。結晶構造解析の結果、TSP7 は P-cadherin Monomer へ結合後、TSP7 同士の立体障害により X-dimer 形成を阻害していることが分かった。また TSP7 は、P-cadherin Monomer に対して構造変化を誘起することで、Strand-swap dimer 形成を阻害していることが分かった。以上の結果から、TSP7 は P-cadherin Monomer へ結合することで 2 種の homo-dimer 形成を阻害していることが強く示唆された。細胞レベルにおいても、TSP7 は Monomer-Dimer 平衡の速さに応じて細胞接着を阻害したことから、Monomer への結合が細胞接着阻害には重要

であると結論づけられた。

4 章では、抗原、抗体双方の理解に基づき、P-cadherin の細胞接着を阻害可能な抗体分子の設計方針に関して考察している。P-cadherin の細胞接着を阻害する抗体分子は、2 つの条件を満たす必要がある。それは、P-cadherin の細胞接着において重要な熱力学的制御と速度論的制御の阻害である。前者は Strand-swap dimer の阻害により達成でき、後者は X-dimer の阻害によって達成できる。以上 2 つの条件を満たす抗体分子は、細胞上の P-cadherin を不活性化でき、細胞接着の阻害を引き起こすことができると結論づけられる。

本研究は、P-cadherin 分子による細胞接着機構と、抗体分子による細胞接着阻害機構を解明しただけでなく、細胞接着阻害分子の一般的な設計方針を構築した点において、P-cadherin を標的とした医薬品開発へ大きく貢献すると考えることができる。さらに、本研究のコンセプトは N-cadherin を代表とする他の細胞接着分子へも適用可能であることから、医薬品開発の分野だけでなく、細胞接着の制御が重要である組織工学、再生医療等の分野へも貢献するものと期待できる。

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。