

## 論文の内容の要旨

論文題目 血小板凝集因子Aggrusの新規血小板結合部位PLAG4の同定と中和抗体による抑制効果

氏名 関口 貴哉

### 【背景】

近年の日本において、がん罹患者の9割はがんの転移によって亡くなると言われている。がんが転移巣を形成するためには、(1) 原発巣からの浸潤、(2) 血管内への侵入、(3) 血流による移動、(4) 血管壁への接着・微小血管での塞栓の形成、(5) 血管外への遊出、といった過程を経る必要がある。この際にごん細胞は(3) 血流による移動において、0.01%しか生存できないと言われているが、この際にごん細胞が血小板と相互作用し、凝集塊を形成することで、微小血管での塞栓の形成促進、血流のせん断応力・免疫細胞からの攻撃の回避により、がんの生存や転移に有利に働くことが知られている。さらに原発巣に浸潤した血小板が、がん細胞特異的に活性化されることで液性因子を放出し、がん細胞の増殖および転移に寄与することが示唆されている。これらのことより、がん細胞と血小板の相互作用を阻害することは有望ながんの治療戦略だと考えられている。

当研究室で血小板凝集誘導因子として同定した Aggrus/podoplanin は高転移性がん細胞の細胞膜に発現する糖タンパク質であり、肺扁平上皮がんや口腔扁平上皮がん、悪性脳腫瘍、悪性中皮腫、膀胱がんなどで高発現が確認されている。Aggrus は血小板表面に発現するレセプターCLEC-2 と結合して血小板を活性化し、血小板凝集を誘導する。Aggrus と CLEC-2 の結合部位は PLAG (PLatelet AGgregation-stimulating)ドメインと呼ばれ、哺乳類では3つの PLAG ドメインが連続した構造を取っている (PLAG1/2/3 ドメイン)。ヒト Aggrus においては PLAG3 ドメインが CLEC-2 との相互作用に関与していることが示されている。当研究室では、PLAG3 ドメインを標的とする抗 Aggrus 中和抗体 MS-1 を創製し、その実験的肺転移の抑制効果を報告してきた。しかしながら、MS-1 抗体による Aggrus-CLEC-2 相互作用の抑制効果は完全ではないこと、PLAG3 ドメインに機能喪失変異を導入しても CLEC-2 との結合は部分的にしか減少しないことから、PLAG3 ドメイン以外にも CLEC-2 との結合部位が存在することが示唆されていた。以上より私は、Aggrus の新たな CLEC-2 結合部位の同定と、中和抗体の作製により、Aggrus 陽性がんを標的とした抗転移薬の開発につなげるこ

を目的として研究を行った。

## 【結果】

### PLAG4 ドメインの同定

私は PLAG ドメインが哺乳類において進化的に保存されていることに着目し、Aggrus タンパク質全長の進化的保存性を調べた。哺乳類 42 種類の Aggrus タンパク質配列を用いて進化的に保存された領域の検索を行ったところ、Aggrus タンパク質配列の中流に、種間で保存された領域を発見した。この領域は興味深いことに PLAG ドメインのコンセンサス配列に類似した構造を有していたことから、この領域を PLAG4 ドメインと命名し、PLAG4 ドメインが CLEC-2 との結合に関与しているのかを明らかにすべく、機能解析を行った。

PLAG3 ドメインにおいて CLEC-2 との結合に重要なアスパラギン酸(D48)とそれに相同な PLAG4 ドメインのアスパラギン酸(D82)をアラニンに変異させた Aggrus を発現する CHO 細胞を作製し(CHO/Aggrus-D48A, -D82A)、FACS を用いて CLEC-2 との結合能を評価した。その結果、PLAG3 ドメインを変異させた Aggrus-D48A よりも、PLAG4 ドメインを変異させた Aggrus-D82A の方が CLEC-2 との結合能が大幅に低下することが分かった。さらに PLAG3/PLAG4 両ドメインを変異させた Aggrus-D48A/D82A は CLEC-2 と結合できなくなることが明らかになった。これらの Aggrus 変異体を発現する CHO 細胞株を用いて血小板凝集実験を行ったところ、PLAG4 ドメイン変異体の方が PLAG3 ドメイン変異体よりも血小板凝集の誘導活性が弱いことが分かった。さらに、PLAG3/PLAG4 両ドメインの変異体は血小板凝集を誘導できないことが明らかになった。

これらの結果より、PLAG4 ドメインは、PLAG3 ドメイン同様 CLEC-2 と相互作用し、血小板凝集を誘導するドメインであることが示された。また、PLAG4 ドメインは PLAG3 ドメインに比べて CLEC-2 との結合能が強いこと、ヒト Aggrus と CLEC-2 の相互作用は PLAG3 ドメインと PLAG4 ドメインの 2 か所を介していることが示唆された。

### PLAG4 ドメインに対する中和抗体の効果

PLAG4 ドメインを直接阻害することによって CLEC-2 との結合を抑制できるかを確かめるべく PLAG4 ドメインを標的とするマウスモノクローナル抗体の作製を行った。PLAG4 ドメインを含む配列を繰り返しつなげたリコンビナントタンパク質を作製し、マウスに免疫した。複数回の免疫後、脾細胞を回収しミエローマと融合することでハイブリドーマを作製した。有用な抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、PLAG4 ドメインに

対する抗体である PG4D1 と PG4D2 という 2 種類の抗体を取得した。これらの抗体は PLAG4 ドメインを含む領域を認識し、非常に強力な結合活性 ( $KD \leq 0.3 \text{ nM}$ ) を有していた。

Aggrus と CLEC-2 のリコンビナントタンパク質を用いて両者の相互作用の中和活性を評価した。すると、PG4D1/PG4D2 抗体は共に Aggrus-CLEC-2 相互作用を濃度依存的に阻害できることが分かった。血小板凝集の抑制効果を評価したところ、PG4D1/PG4D2 抗体の添加によって、Aggrus 依存的な血小板凝集の開始は遅延した。この遅延効果は PLAG3 ドメインに対する中和抗体である MS-1 の阻害効果よりも強力だった。

次にマウス血行性転移モデルを用いて抗体の活性評価を行った。CHO/Aggrus 細胞をマウス尾静脈に注射し、肺表面にできた転移結節数を測定したところ、PG4D1/PG4D2 抗体の投与により、Aggrus 依存的な肺転移はほぼ完全に抑制された。

以上の結果より、作製した抗 PLAG4 抗体 PG4D1/PG4D2 は Aggrus-CLEC-2 相互作用を阻害することで、血小板凝集を抑制し、がん転移を抑制できることが示された。

#### 【まとめ】

本研究では、血小板凝集誘導因子である Aggrus/podoplanin において、理解が進んでいなかった CLEC-2 との相互作用の解明を目指した。結果、新たな結合部位である PLAG4 ドメインを発見し、PLAG4 ドメインが既知の結合部位である PLAG3 ドメインよりも強力に CLEC-2 と結合できることを明らかにした。また Aggrus が PLAG3 ドメインと PLAG4 ドメインの両方を介して血小板と結合し、血小板凝集を誘導していることを示した。そして私は、PLAG4 ドメインに対する中和抗体である PG4D1 と PG4D2 の創製に成功し、これらの抗体が Aggrus を発現するがん細胞の血小板凝集誘導活性、肺転移活性を強力に抑制することを見出した。

以上の結果より、PLAG4 ドメインはがん細胞と血小板の相互作用の阻害を目的とした治療における有望な標的であると言える。そして PLAG4 ドメインに結合する PG4D1/PG4D2 抗体はがん転移を抑制できる有望な分子標的薬になりうるだろう。今後、臨床での応用を目指すために、対象となる患者さんの選定や、治療抗体の投与方法の確立、そして血小板と腫瘍の作り出す微小環境の更なる理解が重要であると考えられる。