

論文審査の結果の要旨

氏名 関口 貴哉

本論文では、血小板凝集誘導因子として知られている Aggrus と血小板上レセプターCLEC-2 との結合に関わる Aggrus 上の新たな結合部位 PLAG4 ドメインを発見したこと、また、PLAG4 ドメインを認識する中和抗体樹立を元にした PLAG4 ドメインの Aggrus 誘導性血小板凝集における役割について述べられている。具体的には、3章からなる本論文の第1章で、Aggrus の新規血小板結合部位 PLAG4 ドメインの発見経緯に関して、第2章で PLAG4 ドメイン認識中和抗体の樹立とその性状解析、第3章で樹立した中和抗体の Aggrus-CLEC-2 結合阻害効果とがん抑制効果に関して述べられている。

序章では、Aggrus に関する先行研究がまとめられている。Aggrus は血小板表面に発現するレセプターCLEC-2 と結合して血小板凝集を誘導する分子として同定された。CLEC-2 との結合に関わる Aggrus 上のドメインは3箇所同定されており、ヒト Aggrus では3番目の PLAG3 ドメインが CLEC-2 との結合に関与する。そこで PLAG3 ドメイン認識抗体がこれまでに樹立され、その抗体の転移抑制効果や抗腫瘍効果が報告されてきた。しかし、PLAG3 認識抗体は Aggrus-CLEC-2 結合を部分的にしか抑制しない。また、PLAG3 ドメインに機能喪失変異を導入しても CLEC-2 との結合が部分的にしか阻害されないため、Aggrus 上には PLAG3 ドメイン以外の CLEC-2 結合部位が存在することが示唆されてきた。

こうした背景を元に本研究では、Aggrus の新たな CLEC-2 結合部位の同定とその部位に対する中和抗体の作製を行い、Aggrus 陽性がんを標的としたより活性の強い抗転移薬の創成を目的として研究が行われた。

第1章では、新規 PLAG4 ドメインの同定に関して述べられている。哺乳類の Aggrus タンパク質配列全長の保存性を評価することで、種間で高度に保存された ED(x)xxT 配列を持つ PLAG4 ドメインを発見した。Aggrus タンパク質の PLAG4 ドメインを変異させてその機能評価を行った結果、PLAG4 ドメインは CLEC-2 と結合し、Aggrus の血小板凝集誘導活性に関与することが明らかになった。さらに、PLAG3 ドメインと PLAG4 ドメインの同時変異によって Aggrus の CLEC-2 への結合活性が喪失することから、PLAG3 と PLAG4 の両ドメインとも CLEC-2 との結合に関与することが明らかとなった。

第2章では、PLAG4ドメイン認識抗体の樹立と樹立した抗体の性状解析について述べられている。PLAG4ドメイン領域を複数連結したペプチド抗原を作製しマウスに免疫することで、PG4D1とPG4D2と命名した2種類の抗体樹立に成功した。これらの抗体は解離定数が非常に小さく剥がれにくいという特性を有しており、Aggrusに不可逆に結合した。またPG4D1とPG4D2抗体が様々ながんが発現しているAggrusに結合できること、低分子量のAggrusをも認識できることを明らかにした。

第3章では、PG4D1抗体とPG4D2抗体のAggrus-CLEC-2結合阻害活性について述べられている。In vitroの活性評価では、PG4D1抗体とPG4D2抗体が濃度依存的にAggrus-CLEC-2結合を阻害した。PLAG3ドメインに対する中和抗体であるMS-1抗体をPG4D2抗体と併用することで、ほぼ完全に血小板凝集を抑制できることが明らかとなった。In vivoでは、Aggrus依存的な実験的肺転移をPG4D1抗体・PG4D2抗体が強力に抑制した。

以上の結果より、本研究で同定したAggrus上の新規ドメインPLAG4は、これまでに知られていたPLAG3ドメインと協同してCLEC-2と結合し血小板凝集を誘導しているという新規分子機構が明らかとなった。この血小板凝集は樹立したPLAG4ドメイン認識抗体で阻害可能であり、さらに樹立した抗体が実験的肺転移を抑制したことから、PLAG4ドメインはAggrus発現がんの治療標的として有望であること、樹立したPG4D1抗体・PG4D2抗体を元にしたがん転移抑制剤が創成できる可能性が示唆された。

本論文中で示された結果は論文提出者が主体となって解析及び検証を行ったものであり、英語論文の共著者に含まれる竹本愛、高木聡、高鳥一樹、佐藤重男、高見美穂、藤田直也は実験のサポート、論文執筆、研究指導のみに関わったことを考慮すると、本論文の成果に対する論文提出者の寄与は十分であると判断する。

したがって、博士（医科学）の学位を授与できると認める。

以上 1938 字