

# 論文審査の結果の要旨

氏名 宮田 憲一

本論文では、血小板凝集促進因子として知られている Podoplanin (PDPN) の腫瘍増大に与える分子機構解析並びに *in vivo* スクリーニングを用いた新規転移抑制分子の同定に関する研究成果が述べられている。具体的には、本論文の第1章において、*in vivo* 特異的な PDPN による腫瘍増殖促進活性には PDPN を介した血小板凝集が関わっていることを明らかにした結果が述べられるとともに、第2章において、*in vivo* スクリーニングによる新規転移抑制分子のスクリーニングとそこから見出された新規分子 X の転移抑制に関わる研究成果が述べられている。こうした研究を宮田君が始めたきっかけには、PDPN 陰性肺腺がん由来 A549 細胞と比較した場合に、PDPN 陽性肺扁平上皮がん由来 PC-10 細胞のマウス皮下移植腫瘍中には漏出している血小板が多いという当研究室の過去の研究結果に対して、PDPN を介した血小板凝集により放出される液性因子が依然として明らかでなくその分子に興味を持ったことが第一に挙げられる。また、PDPN の強制発現は運動・浸潤能を高めて皮下移植時における肺転移（自然転移）を促進するとの先行研究報告がある一方で、PDPN を内在的に発現している細胞株の中には自然転移を起こさない細胞株も存在していることを発見し、これらの細胞では PDPN 以外の転移制御機構が働いていると考えたことも本研究を始めたきっかけとなっている。

そこで宮田君は、肺扁平上皮がん (LSCC) 細胞に発現している PDPN を CRISPR-Cas9 法を用いてノックアウトすると、*in vitro* における細胞増殖能には影響が無いにも関わらず *in vivo* における腫瘍増殖が著しく抑制されることを見出すとともに、PDPN 陰性細胞に PDPN を強制発現させると逆に *in vivo* における腫瘍増殖が促進されるが *in vitro* における細胞増殖能には影響を与えないことを見いだした。PDPN 強制発現株をマウスに移植して形成された腫瘍内には、活性化血小板が多く検出されたため、PDPN による血小板凝集誘導が腫瘍増大の直接的な原因となっている可能性をさらに検討した。*In vitro* の実験系において、LSCC 細胞は PDPN 依存的に血小板凝集を惹起したが、その血小板凝集に伴って放出された液性因子が LSCC 細胞の細胞増殖を促進していることを確認した。また、PDPN 依存的な血小板凝集を起こした反応上清中には、LSCC 細胞の EGFR を活性化する増殖因子が含まれていることを Phospho-RTK Array 解析で見出した。こうした

結果は、LSCC 細胞を移植したマウスに形成された腫瘍においても確認され、抗血小板薬投与あるいは抗 PDPN 中和抗体投与により血小板凝集を抑制すると腫瘍増大と EGFR リン酸化抑制が確認された。これらの結果から、PDPN は脆弱な腫瘍血管から漏出した血小板を活性化することで血小板内の EGF を含む EGFR リガンドの放出を促し、その結果として腫瘍増大を促進していることが明らかとなった。

さらに、自然転移を起こさない PDPN 陽性がん細胞における転移抑制機構の解明を目指し、*in vivo* スクリーニングを行うことで、分子 X を新規転移抑制分子として同定することに成功した。新規分子 X 陽性がん細胞における新規分子 X のノックダウンは、*in vitro* における細胞運動・浸潤能を促進し、逆に新規分子 X を新規分子 X 陰性がん細胞に過剰発現させると *in vitro* における細胞運動能が抑制された。よって、新規分子 X は細胞運動能を負に制御することで自然転移を抑制している可能性が示唆された。さらに、新規分子 X の発現レベルが膀胱がん患者の悪性度（グレード）と逆相関していたことから、膀胱がん患者における転移バイオマーカーとして新規分子 X が有用である可能性が示唆された。

本論文中で示された結果は宮田君自身で遂行した実験の結果であり、英語論文の共著者に含まれる熊本大学大学院生命科学研究部の森岡弘志教授は研究遂行に必要な方法論の教授と試薬の提供にのみ関与した。さらに、(公財)がん研究会の高木聡(元)特任研究員、佐藤重男主任研究助手、芝清隆部長、南澤宝美后研究助手、高見美穂研究助手、藤田直也所長は実験手技上のサポートあるいは論文執筆や研究指導にのみ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 1,850 字