

論文審査の結果の要旨

氏名 久田 洋平

本論文は全三章から成り、第一章は背景と目的、第二章は *in vitro* における抗フィブリンクロット特異抗体 102-10 の性状解析、第三章は *in vivo* における抗フィブリンクロット特異抗体 102-10 の腫瘍集積性の評価と臨床検体における悪性度とフィブリンクロットの沈着の相関について述べている。

第一章では、がんと血液凝固に関する先行研究を紹介し、血液凝固カスケードの詳細、そして、本研究の主要タンパクであるフィブリンクロットの形成に関して述べている。更に当該研究室で提唱している「がん組織における悪性凝固サイクル」理論によって、フィブリンクロットががんの病態特徴的なタンパクになりうること、がん間質に形成されたフィブリンクロットを標的とした新しい Drug delivery system (DDS) の戦略として「間質 targeting」を目指していることを述べている。本章の最後に当該研究室で確立した抗フィブリンクロット抗体 102-10 を用いて、①*in vitro* において、102-10 の詳細な性状を明らかにすること、②*in vivo* において、102-10 の DDS ツールとしての有用性を評価すること、③様々な病態の臨床検体を用いてフィブリンクロットの多寡を確認し、がんの悪性度とフィブリンクロットの多寡の関連性を評価することを研究目的とする旨を述べている。

第二章では、前半で 102-10 の特異性に関して言及している。ELISA、蛍光免疫染色を用いて、102-10 が不溶性のフィブリンクロットのみ反応するが、フィブリノゲン、可溶性フィブリン、D-ダイマー、がん関連プロテアーゼによるフィブリンクロット分解物といった可溶性のタンパクに反応しないことを示した。章の後半では、102-10 のエピトープの同定と、フィブリンクロットが形成された時に限り 102-10 のエピトープが立体構造変化を起こすことを示した。変性条件のフィブリノゲンの B β 鎖に 102-10 が反応することを見出し、B β 鎖のリシルエンドペプチダーゼ処理、アミノ酸シーケンス、合成ペプチドを用いた競争阻害といった手法によって、102-10 のエピトープとして 16 アミノ酸の同定に至った。また、102-10 のエピトープ部はフィブリノゲンでは、疎水性相互作用と水素結合によって強固に結合しているが、フィブリンクロットになるとそれらの結合が壊れてエピトープ部に空間が生じることを証明した。この構造変化はこれまでに報告が無く、不溶性のフィブリンクロットと可溶性のフィブリン関連分子を見分けることができる唯一の構造変化を発見した。

第三章では、腭がんトランスジェニックマウスと化学発がんマウスモデルの 2 種類の自然発がんマウスモデルに対する 102-10 の腫瘍集積性の検討と、102-10 を用いてヒトの臨床検体の組織免疫染色を行った。腫瘍集積性の検討に関しては、2 種類の自然発がんマウスモデルのそれぞれで 102-10 は高い腫瘍集積性を示した。そして、脳腫瘍の代表であるグリオーマの検体 60 例に対して、102-10 を用いたフィブリンクロットの免疫染色を行ったところ、がんの悪性度とフィブリンクロットの沈着に相関を認めた。一方、非悪性疾患の検体に対する 102-10 を用いたフィブリンクロットの免疫染色の結果から、急性期の疾患でのみフィブリンクロットの沈着が見られ、陳旧性あるいは慢性の疾患ではフィブリンクロットの沈着が見られないことを示した。

今後の展望として、本研究の手法を利用したフィブリンクロットやその他の病態関連不溶性タンパクの更なる構造解明の重要性を述べた。また、過去に作られてきた抗フィブリン抗体と比較して、がんの診断や治療における 102-10 の優位性について言及した。最後に、これまでほとんど報告がされていない不溶性タンパクと抗体の分子間相互作用解析法の確立に向けた試みを紹介した。

本研究は、不溶性のフィブリンクロットのみで見られる新規構造変化の発見と、がん間質のフィブリンクロットを標的とした診断及び治療の基盤の確立という、生命科学と医科学の両面において優れた成果を示した。

なお、本論文第二章と第三章は、国立がん研究センター東病院の安永正浩博士、花岡慎悟博士、西條信史博士、静岡県がんセンターの杉野隆博士、放射線医学総合研究所の佐賀恒夫博士、辻厚至博士、東京大学医科学研究所の津本浩平博士、理化学研究所の眞鍋史乃博士、熊本大学の倉津純一博士、黒田順一郎博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1929 字