

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 「がん微小環境を標的とした革新的治療法の実現」（血小板との相互作用によるがん微小環境制御機構の解析と新規治療薬の創製）
2. 研究開発代表者： 公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター 藤田直也
3. 研究開発の成果

がんは、我が国において死因の第1位となっており、今後、2人に1人ががんに罹患するという研究結果もある。このような状況において、がんを克服するための最大の難関である浸潤と転移を克服する治療法を開発することが急務である。そこで、研究開発代表者は、血小板との相互作用によるがん微小環境制御機構の解析と新規治療薬の創製を目的に研究開発を行った。本研究開発において対象としている Aggrus 分子は、研究開発代表者らが高転移がん細胞膜表面に発現している転移促進分子として見出した分子で、血小板上の CLEC-2 分子と相互作用することにより血小板凝集を誘導する。そこで、Aggrus 分子が持つ血小板凝集誘導活性を阻害する中和抗体並びに低分子化合物をスクリーニングし、臨床応用に向けた開発研究を行うことを目的として研究開発を進めた。具体的には、①「Aggrus 標的の妥当性検討」として、肺扁平上皮がんの臨床検体より、Aggrus 陽性の肺扁平上皮がん細胞株を樹立すること、②「Aggrus 標的中和抗体の作製」として、CLEC-2 分子との相互作用に関わる Aggrus 分子上の PLAG4 と命名した新規ドメインを認識し Aggrus 分子の血小板凝集誘導活性を抑制する Aggrus 阻害抗体を作製すること、③「Aggrus 阻害低分子化合物の同定」として、Aggrus 分子の血小板凝集誘導活性を阻害する低分子化合物を創製することを目的とした。

①「Aggrus 標的の妥当性検討」に関しては、がん研究会の臨床研究倫理審査委員会で承認された手法に従い、日本人肺扁平上皮がん由来の 70 検体からポドプラニン陽性ヒト肺扁平上皮がんの樹立を試みた。樹立に成功した 8 株のうち 6 株でポドプラニン発現が確認された。その 6 株をヌードマウスへ皮下移植または尾静脈移植することで、担がんモデルや転移モデルとして使用可能か検討したところ、2 株が担がんモデルとして利用可能であり、さらにそのうちの 1 株が血行性転移モデルに使用可能であることが確認された。

②「Aggrus 標的中和抗体の作製」に関しては、PLAG4 を認識するモノクローナル抗体作製を行った。がん研究会で 3 抗体、研究支援基盤の方で 5 抗体樹立することに成功した。これら 8 抗体を各々産生するハイブリドーマを大量培養し精製抗体を取得した。これら精製抗体の Aggrus 中和活性を確認することで、がん研究会で樹立した PG4D1 抗体と PG4D2 抗体をリード展開用として選択した。PG4D1 抗体と PG4D2 抗体は PLAG4 ドメインへの Affinity が極めて高く（解離定数が $3 \times 10^{-10} \text{M}$ 以下）、かつ Aggrus 発現がんの *in vivo* における血行性転移を抑制した。また、PG4D1 抗体と PG4D2 抗体のヒトキメラ抗体発現ベクターの作製を完了し、ヒトキメラ型 PG4D2 抗体を精製することで、PLAG4 ドメインを認識することを確認した。PG4D1 抗体と PG4D2 抗体に関しては特許出願を行った。

③「Aggrus 阻害低分子化合物の同定」に関しては、がん研究会で確立したアルファスクリーニング系を用いて、天然物を含む約 11,000 化合物よりなる産総研ライブラリー・天然物を含む約 32,000 化合物よりなる理研 NPDepo あるいは東大コアライブラリーを研究支援基盤にてスクリーニングすることで、10 種類のヒット化合物を見出すことに成功した。各支援基盤から提供を受けたヒット化合物 10 種類を、フローサイトメーター法、血小板凝集阻害アッセイなどの高次アッセイ系で活性を確認した。