

学位論文審査結果の要旨

氏 名	加賀城 真理
審査委員	主 査 今井 祐記 副 査 渡部 祐司 副 査 矢野 元 副 査 原 祐子 副 査 松原 裕子

論 文 名

CBF1 を標的とした Single-Strand DNA Aptamer による血管新生抑制

審査結果の要旨

[研究概要]

血管新生は多様な疾患に関与しており、特に腫瘍の増殖と転移、加齢黄斑変性においては過剰な血管新生が病態の成因の一つである。現在までに VEGF シグナルを阻害する医薬品が臨床応用され、一定の治療効果を得ている一方で、高血圧等の有害事象や長期投与による薬剤耐性が問題視されており、VEGF や VEGFR 以外を標的とした新しい血管新生阻害剤の開発が急務である。申請者は、VEGF シグナル以外を標的とした新しい血管新生阻害剤のシーズ導出を目的とし、血管内皮細胞増殖抑制を誘導する Notch シグナルの主要転写因子である CBF1 の機能を亢進させる single-stranded DNA (ssDNA) アプタマーの開発を目的として本研究を行なった。

Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)法を用いて、CBF1 に結合する ssDNA アプタマーの *in vitro* selection を実施した結果、解離定数 (Kd)が 30-300 nM の CBF1 結合 ssDNA アプタマーを 15 種類同定し、Apt-1～Apt-15 と命名した。これら 15 種類の ssDNA アプタマーを用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) の血管新生能に対する薬効を評価した。その結果、Apt-1、3、4、5 及び 6 の 5 種類の ssDNA アプタマーが、コントロール群と比較し血管新生を 30～50%抑制した。これらのアプタマー処理後も *IFNβ*、*IL-8* の mRNA 発現上昇

は認められず、cyclic GMP-AMP synthase/STING 経路や TLR 経路の活性化は起きていないことを確認した。また、これら 5 種類の ssDNA アプタマーのうち、Apt-3 は CBF1 の標的遺伝子である *Hey2* の mRNA 量を有意に上昇させた。最後に、ALPHA Screen を行った結果、Apt-3 は CBF1 の LAG1 domain の 158 から 178 アミノ酸領域 (SKRIKVISKPS KKKQSLKNAD) に結合していることを見出した。

以上の結果から、CBF1 に結合してその機能を亢進させる事で血管新生を阻害する ssDNA アプタマーとして Apt-3 を単離する事に成功したと結論づけた。

[審査結果]

公開審査会は、令和 3 年 8 月 11 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した。審査員から本研究に対して、

1. 研究開始した際の具体的に標的とした腫瘍や疾患
2. アプタマーによる EGFR シグナルへの影響
3. 正常血管だけでなく腫瘍血管へのアプタマーの作用
4. DDS の腫瘍選択性を向上させるために必要な工夫
5. アプタマーによる抗体療法と同様な耐性発生の可能性
6. 抗体と比較してアプタマーによる治療の優れている点
7. アプタマーによる Notch シグナル活性化で考えられる副作用
8. In vivo でアプタマーを評価する際に考慮すべき点
9. アプタマーによる治療効果をより向上させるための方策
10. 単離したアプタマーの VEGF 阻害治療効果以外に考えられる応用方法
11. 薬剤としてアプタマーの配列と低分子化合物との自由度の違い
12. 細胞質におけるアプタマーと CBF1 の共局在
13. アプタマーの結合による CBF1 分子機能活性化のメカニズム
14. 多様なアプタマーのうち、ssDNA アプタマーを選択した理由
15. Notch リガンド不在時のアプタマーによる CBF1 活性化の可能性

などについて日本語で質問がなされ、申請者は自らの研究結果やこれまでの報告から得られた知見、今後の展望も踏まえて、すべての質問に日本語で適切に回答した。

以上、審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。