

(様式5)

学位論文要旨

令和 6年 1月 10日

学位申請者

(栗本 大輔) 印

学位論文題目

アルブミン融合ヒトラクトフェリンの抗腫瘍活性増強

学位論文の要旨

ヒトラクトフェリン (hLF)は自然免疫に関与する多機能性タンパク質であり、唾液、涙、母乳などの外分泌液や血液に多く含まれる。hLFは抗腫瘍、抗炎症、抗菌、や抗ウイルス作用など様々な生理活性が報告されており、創薬の観点から非常に興味深いタンパク質である。これまでに、hLFの血中安定性を高めるために開発したヒト血清アルブミン (HSA)融合hLF (hLF-HSA)は、ヒト肺腺がん細胞PC-14に対して高い増殖阻害活性を示すことを見出している。HSA融合は、主にHSAが活性化するかベオラ依存性エンドサイトーシスによって、融合タンパク質をHSAの取り込み経路で細胞内に送達する技術である。本研究では、hLF-HSAのがん細胞に対する細胞増殖阻害メカニズムとして、その細胞内取り込みに着目した。本研究では、hLF-HSAを使用し、その細胞内取り込みとがん細胞に対する増殖阻害活性を検証した。更にその抗腫瘍メカニズムとして、近年注目されているNHE7によるがん細胞内pH制御に焦点を当て、その解明を目指した。

第2章「アルブミン融合によるヒトラクトフェリンの細胞内送達促進と抗腫瘍活性増強」では、hLFにHSAを融合することで、ヒト肺腺がん細胞株PC-14に対する細胞内取り込みが促進され、増殖阻害活性が向上することを見出した。さらに、融合タンパク質をがん細胞に輸送するタンパク質であるHSA単独は細胞内に取り込まれず、hLFのような細胞表面に集積するタンパク質との融合がその効率化を図ることを明らかにした。

PC-14細胞にHSA単独を添加した場合、驚くことに細胞内に取り込まれなかった。hLFとHSAとの同時添加は、それらの細胞内取り込みに影響しなかった。また、それらの同時添加は細胞増殖においても影響しなかった。その一方でhLF-HSAを添加した場合、コントロールと比較して、増強した細胞内取り込み、及び増殖阻害活性を示した。これは、hLFとHSAの融合の重要性を示唆している。次に、hLF-HSAがカベオラ依存性エンドサイトーシスを活性化するかどうかを解析した。今回は、ウエスタンブロットにてリン酸化型のCav-1を検出する抗体を用いて、カベオラ依存性エンドサイトーシスの活性化を解析した。その結果、融合タンパク質は相乗的にカベオラ依存性エンドサイトーシスを活性化した。この結果は、hLF-HSAの細胞内取り込み及び増殖阻害の結果と一致している。HSAとhLFとの融合は、カベオラ依存性エンドサイトーシスの活性化を増強し、細胞内に取り込まれるために重要であることが示唆された。

hLF-HSAの増強した細胞内取り込み及び細胞増殖阻害活性がカベオラ依存性エンドサイトーシスの活性化によるものなのかを確認するために、カベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害剤とカベオラ依存性エンドサイトーシス関連タンパク質であるCav-1のノックダウンによりカベオラ依存性エンドサイトーシスを阻害した。カベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害により、hLF-HSAの細胞内取り込み及び細胞増殖阻害活性が抑制された。したがってhL

F-HSAの細胞内取り込みは確かにカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナルに基づくことが確認された。つまり、hLF-HSAはカベオラ依存性エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれることで、増強した細胞増殖阻害活性を示すことが確認された。

hLFとHSAを同時に添加した場合、hLFは細胞内に取り込まれないことから、hLF-HSAのhLFと細胞表面上のGAGsとの相互作用がその細胞内取り込みに重要な働きをする可能性を考えた。細胞表面のGAGsの硫酸基付加反応の阻害剤として用いられているNaClO₃や、競合剤としてGAGsであるヘパリンや過剰量のhLFで細胞を処理し、hLF-HSAのhLFと細胞表面のGAGsとの結合を阻害した。その結果、hLF-HSAの細胞内取り込みが抑制された。更に、ヘパリン処理によって、hLF-HSAの増殖阻害活性は減弱した。これは既に知られているhLFと、細胞表面上のGAGsとの結合が、hLF-HSAの細胞内取り込みに重要な働きをすることを示している。

HSA単独は十分にカベオラ依存性エンドサイトーシスを活性化せず、細胞内に取り込まれなかった。これは、HSAが負に帯電する酸性タンパク質であるために、負に帯電したGAGsが発現する細胞表面から静電的な反発を受け近接できず、カベオラ依存性エンドサイトーシスを活性化できなかったと考えた。そこで、HSAと細胞表面上のGAGsとの静電的反発を解消するために、細胞にGAGsの硫酸基付加反応の阻害剤であるNaClO₃を施した。GAGsの硫酸基を減少させることで、HSAの細胞内取り込みは改善された。つまり、HSA単独はGAGsとの静電的な反発を受け、細胞表面に近接できず、細胞内に取り込まれにくい状態にあることが示された。一方で、hLF-HSAの場合は、hLFとGAGsとの相互作用により、融合されたHSAが細胞表面へ速やかにリクルートされ、HSAによるカベオラ依存性エンドサイトーシスの活性化が効率的に行なわれる。そして細胞内に送達されたhLFの増強した細胞増殖阻害活性が発揮されたと考えられる。

本研究では、HSA融合技術を駆使して、hLFの細胞内送達システムを確立し、その細胞内取り込みと活性との関係を明らかにした。hLFにHSAを融合することは、hLFをバイオ医薬品として開発するための新たな戦略として期待されると考えられる。

第3章「アルブミン融合によるヒトラクトフェリンの新たな抗腫瘍メカニズムの発見」では、第2章で検証されたhLFの細胞内送達技術を利用して、ヒト肺腺がん細胞株PC-9に対する増殖阻害メカニズムを明らかにした。具体的には、細胞内に送達されたhLFが、トランスゴルジネットワーク (TGN)に発現するNHE7の発現量を上昇させ、TGNがアルカリ化することで、がん細胞の増殖が抑制されることを明らかにした。

PC-9細胞にhLF又はHSAを単独、あるいは同時に添加した場合、細胞内のpHへの影響はなかったが、hLF-HSAの場合、細胞内小器官がアルカリ化された。hLF-HSAの取り込み経路であるカベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤で処理することでhLF-HSAのアルカリ化効果がベーサルなラインまで減弱したことから、細胞内に送達されることがその活性発現に重要であることが確認された。

HSA融合によって細胞内に取り込まれたhLF又はHSAのどちらかがNHE7を活性化し、細胞内をアルカリ化するのかを検証するために、カベオラ依存性エンドサイトーシスの活性剤であるオカダ酸を使用し、hLF及びHSAの細胞内取り込みを促進させた。その結果、hLFを細胞内に送達させることで、hLF-HSAと同様に細胞内のアルカリ化が誘導された。その一方で、HSAではその効果が見られなかった。したがって、細胞内に取り込まれたHSAではなく、hLFが細胞内小器官をアルカリ化することが示された。

本研究で着目している細胞内小器官膜型NHE7がhLF-HSAによる細胞内小器官のアルカリ化に関与しているかどうかを調べるために、NHE7をノックダウンした。NHE7をノックダウンすることで、hLF-HSAの細胞内小器官のアルカリ化効果及び増殖阻害活性が減弱した。したがって、細胞内に送達された、hLFが、細胞内小器官であるTGNに発現するNHE7を活性化することで、TGNのアルカリ化を誘導し、細胞増殖を抑制していることが示された。

NHE7の活性化メカニズムとして細胞内に送達されたhLFがその発現レベルを上昇させている可能性を考えた。hLF又はHSAを単独、あるいは同時に添加した場合、その発現レベルに影響はなかったが、hLF-HSAの場合、NHE7の発現レベルは上昇された。hLF-HSAの細胞内局在を解析したところ細胞核には局在しなかった。したがって、細胞内に送達されたhLFはNHE7の発現レベルを転写因子として制御したのではないことが示された。このメカニズムを解明

するには、更なる検証が必要である。

まとめると、細胞内に送達されたhLFは、NHE7を活性化する因子であることが示された。がん治療のターゲット分子として注目されるNHE7を活性化する分子の報告はhLFが初めてであり、hLF-HSAは今後のNHE7の研究の更なる貢献が期待される。また、NHE7のノックダウンでは細胞増殖に影響がなかったことから、NHE7を阻害するのではなく、活性化することが肺がん治療において有効である可能性が示唆された。

本論文は、がん細胞のNHE7によるpH 恒常性の機構についての理解を深め、TGN pHを標的とするがんの新たな治療戦略の可能性を示すものである。

以上のことより、hLFにHSAを融合することで、hLFと細胞表面上のGAGsとの相互作用を介して、HSAの細胞内取り込みシグナルをより効率化し、細胞内に取り込まれることを明らかにした。また、hLFの細胞内送達を向上させることで、その細胞内送達と抗腫瘍活性との関係を明確にした。更に、細胞内に送達されたhLFはNHE7を活性化することで細胞内小器官をアルカリ化するという新しい抗腫瘍メカニズムを明らかにした。以上より、hLFへのHSA融合は、hLFの生理活性を飛躍的に高めることが可能なことから、そのバイオ医薬品開発において、大いに貢献できると期待される。

S u m m a r y

Applicant for degree: January 10th, 2024

(Daisuke Kurimoto)

Title of thesis :

Enhanced anti-tumor activity of albumin-fused human lactoferrin.

Human lactoferrin (hLF) is a multifunctional protein with anti-tumor activity. We have previously found that human serum albumin fused hLF (hLF-HSA), developed to increase the blood stability of hLF, exhibits high growth inhibitory activity against human lung adenocarcinoma cells PC-14. HSA fusion is a technique whereby the fusion protein is delivered into the cells by caveolae-dependent endocytosis activated primarily by HSA by the HSA uptake pathway, a technique whereby the fusion protein is delivered into the cell by the HSA uptake pathway. In this study, we focused on the intracellular uptake of hLF-HSA as a mechanism of cell growth inhibition against cancer cells. In this study, the growth inhibitory activity and intracellular uptake against human lung adenocarcinoma cells were verified. It was found that hLF is taken up intracellularly by HSA fusion, and a new anti-tumor mechanism was discovered.

Fusion of HSA to hLF promoted its intracellular uptake and enhanced its growth-inhibitory activity against cancer cells. The interaction of hLF with sulfated glycosaminoglycans (GAGs) on the cell surface was found to be important for the mechanism. Specifically, the acidic protein HSA alone was difficult to activate caveolae-dependent endocytosis due to electrostatic repulsion with negatively charged GAGs on the cell surface and was itself difficult to take up into the cell. In contrast, in the case of hLF-HSA, the interaction between hLF and GAGs resulted in rapid recruitment of the fused HSA to the cell surface, indicating efficient activation of caveolae-dependent endocytosis signaling by HSA.

Furthermore, using this developed intracellular delivery technology of hLF, the mechanism of growth inhibition against the human lung adenocarcinoma cell line PC-9 was clarified. Specifically, hLF-HSA is taken up intracellularly and activates NHE7 expressed in intracellular organelles. As a result, the intracellular organelles are alkalized, which was shown to inhibit PC-9 cell proliferation.

In conclusion, hLF fusion with HSAs more efficiently activates HSA intracellular uptake signals via interaction with GAGs on the cell surface, resulting in efficient intracellular uptake of hLF. In addition, by improving the intracellular delivery of hLF, the relationship between the intracellular delivery and activity of hLF and the novel anti-tumor mechanism of hLF was revealed. In summary, HSA fusion to hLF is expected to be a powerful weapon in its biopharmaceutical development, as it can enhance the biological activity of hLF.