

(様式 1 1)

## 博士学位論文審査結果要旨

西暦

2024年 2月 29日

研究科、専攻名 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻

学位申請者氏名 栗本 大輔

論文題目 アルブミン融合によるヒトラクトフェリンの抗腫瘍活性増強

### 審査結果の要旨

本学位論文の審査は、提出論文の内容、口頭発表、質疑応答及び筆記試験に基づき、5名の審査員（主査：矢野 和義 教授、副査：村上 優子教授、佐藤 淳 教授、西 良太郎 准教授、岡田 麻衣子 助教）によって行われた。

2023年11月17日に行われた予備審査会では、論文の緒論及び考察の記載に良、質ともに不足があること、第2章と第3章との論理的な繋がりが不明瞭であるとの指摘がなされた。予備審査会での指摘事項を修正した論文が2024年1月10日に再提出され、再提出された論文内容に沿った学位審査公開発表会が1月24日に開催された。発表会では、以下の要旨に示す学位論文に関する発表と関連する質疑応答が行われた。

ヒトラクトフェリン (hLF) は抗腫瘍活性を有するタンパク質であり、抗がん剤開発の観点から、大変興味深いタンパク質である。hLFはガン細胞内に取り込まれることで、その抗腫瘍活性が発現すると考えられているが、その関係は未だ明らかにされていない。そこで、hLFのガン細胞内送達を目的として、ヒト血清アルブミン (HSA) 融合技術に着目した。HSA融合とは、主にHSAの細胞内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で、融合タンパク質を細胞内に送達する技術である。本論文では、CHO細胞で調製したhLFとHSAとの融合タンパク質 (hLF-HSA) のヒト肺腺ガンPC-14細胞への向上した細胞内取り込みとそのメカニズム、さらにヒト肺腺ガンPC-9細胞へ送達されたhLF-HSAの細胞増殖阻害メカニズムを解明した。

第1章では、本研究の背景であるhLFの抗腫瘍活性、HSA 融合技術、さらに、hLF-HSAの細胞増殖阻害の機序として注目したNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 (NHE) による細胞内小器官pH制御について簡潔に説明し、本研究の目的と意義を述べた。

第2章では、hLFはヒト肺腺ガンPC-14細胞には取り込まれにくく、主に細胞表面に局在することを明らかにした。hLFとHSAとの融合タンパク質であるhLF-HSAは、PC-14細胞内に取り込まれたのに対して、融合しないhLFとHSAとの同時添加では、hLFのみと同様に、細胞内には取り込まれにくいこと、さらに、細胞内により取り込まれたhLF-HSAは、PC-14細胞の増殖を阻害することを確認した。hLF-HSAの細胞内取り込みが、カベオラ依存性エンドサイトーシスに基づいていることを

確かめるために、その取り込みで重要な働きをするCaveolin-1のリン酸化をウエスタンブロット法で検出した。融合タンパク質hLF-HSAは、hLFのみ、あるいはhLFとHSAとの同時添加と比較して、高いCaveolin-1リン酸化を示した。hLFとHSAとの融合によるカベオラ依存性エンドサイトーシスの活性化については、hLF-HSAのhLFと細胞表面上に発現する糖鎖である硫酸化ガラクトサミノグリカン(GAGs)との相互作用が重要な働きをすることを明らかとした。HSAは負に帯電する酸性タンパク質であるために、負に帯電した細胞表面のGAGs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い。一方、hLF-HSAの場合は、hLFとGAGsとの相互作用により、融合されたHSAが細胞表面へ強制的にリクルートされ、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。その結果、hLF-HSAが細胞内に送達されて、hLFの増強したガン細胞増殖阻害活性が発現することを明らかとした。

第3章では、第2章で明らかにされたhLFのHSA融合による細胞内送達技術を利用して、ヒト肺腺がんPC-9細胞に対するhLF-HSAの増殖阻害メカニズムを明らかにした。hLF-HSAは、PC-14細胞と同様に、PC-9細胞に取り込まれてその増殖を阻害した。細胞内に取り込まれたhLF-HSAは、その細胞内小器官をアルカリ化したのに対して、取り込まれないhLFのみ、あるいは融合しないhLFとHSAとの同時添加は、細胞内小器官pHに影響しなかった。hLF-HSAによる細胞内小器官のアルカリ化は、トランスゴルジネットワーク (TGN)で発現、機能する $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体 (NHE)7の機能促進によること、その遺伝子ノックダウンで明らかとなった。細胞内に送達されたhLF-HSAは、NHE7の発現量を上昇させること、これにより、NHE7の機能が促進され、TGNから $\text{H}^+$ が放出されアルカリ化し、ガン細胞の増殖が阻害されるメカニズムが明らかとなった。

以上より、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抗腫瘍活性との関係を明らかにした。さらに、細胞内に送達されたhLFは、NHE7の機能を促進し、細胞内小器官をアルカリ化することで、ガン細胞の増殖を阻害するという新しい抗腫瘍メカニズムを明らかにした。

英語力及び専門分野の学力については、筆記試験が実施され、解答にややミスがあるものの、ほぼ満足のいく結果であった。

以上より、審査員全員から、申請者の論文が博士論文として価値があり、博士の学位を得るにふさわしい資格を有していると判断された。

審査委員 主査

東京工科大学 教授 矢野 和義