

東京工科大学
博士学位論文

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

2024年3月

栗本 大輔

目次

第1章 緒論	1
第1節 緒言	1
第2節 ヒトラクトフェリン (hLF).....	2
第1項 hLF の役割及び構造.....	2
第2項 hLF の抗腫瘍活性.....	4
2-1. 免疫賦活を介した間接的な抗腫瘍活性.....	4
2-2. がん細胞に対する直接的な抗腫瘍活性.....	6
第3項 hLF の細胞内取り込み.....	7
第3節 ヒト血清アルブミン (HSA).....	9
第1項 HSA の血中安定性.....	9
第2項 HSA のがん組織での働き.....	12
第3項 がん細胞での HSA の代謝様式.....	12
第4項 HSA の受容体を介した薬物送達促進.....	13
第5項 HSA を応用した抗がん剤.....	14
第4節 HSA 融合 hLF 融合タンパク質 (hLF/HSA).....	15
第5節 がんの増殖と pH	17
第1項 プロトン (H ⁺) の受動輸送と能動輸送	18
第2項 細胞内小器官 pH 恒常性モデル.....	19
第6節 ナトリウムイオン (Na ⁺) / H ⁺ 交換輸送体 (NHE)	21
第1項 NHE のアイソフォーム及び細胞内局在.....	22
第2項 細胞内小器官膜型 NHE による細胞内小器官 pH 制御.....	24
第3項 細胞内小器官膜型 NHE7 による細胞内 (細胞内小器官及び細胞質) pH 制御	24
第7節 ゴルジ体	26
第1項 ゴルジ体の構造及び役割	26
第2項 トランスゴルジ網 (TGN)	28
第8節 本研究の目的と意義	29

第2章 HSA 融合による hLF の細胞内送達促進と抗腫瘍活性増強 .. 30

第1節 緒言	30
第2節 実験方法	30
第1項 細胞培養	30
第2項 タンパク質の調製	31
2-1. 鉄飽和型 (Holo) hLF.....	31
2-2. HSA	32
2-3. Holo hLF-HSA.....	32
2-4. Alexa Fluor 488-標識タンパク質	33
第3項 Alexa Fluor 488-標識タンパク質を用いた細胞内取り込み	33
第4項 RNA 干渉	35
第5項 免疫蛍光染色法による細胞内取り込み	36
第6項 細胞増殖試験	38
第7項 ウェスタンブロッティング	40
第8項 結合試験	43
第9項 統計解析	43
第3節 結果と考察	44
第1項 ヒト肺線がん細胞株 PC-14 における hLF の細胞内取り込みに 対するカベオラ依存性エンドサイトーシス活性剤の影響	44
第2項 hLF、HSA 又は hLF-HSA の細胞内取り込み及びそれらが細胞 の増殖に及ぼす影響	45
第3項 hLF-HSA の細胞内取り込み及び増殖阻害活性に対する培地中 に含まれるウシ胎児血清 (FBS)の影響	49
第4項 hLF-HSA 処理によるカベオラ依存性エンドサイトーシスシグ ナルへの影響	50
第5項 hLF-HSA の細胞内取り込み及び増殖阻害活性に対するカベオ ラ依存性エンドサイトーシスの阻害の影響	52
第6項 hLF-HSA の細胞内取り込み及び増殖阻害活性に対する細胞表 面上の硫酸化グリコサミノグリカン (GAGs)阻害の影響.....	56
第7項 HSA の細胞内取り込みに対する GAGs 阻害剤の影響.....	60
第8項 hLF-HSA の細胞内取り込みメカニズム.....	62
第4節 結言	64

第3章 HSA 融合による hLF の TGN pH 制御	65
第1節 緒言	65
第2節 実験方法	66
第1項 細胞培養	66
第2項 タンパク質の調製	66
第3項 RNA 干渉	66
第4項 免疫蛍光染色法による細胞内取り込み	67
第5項 蛍光 pH プローブを用いた細胞内 pH 試験	68
第6項 細胞増殖試験	70
第7項 ウェスタンブロッティング	70
第8項 蛍光標識タンパク質及び細胞内小器官マーカーを用いた免疫 蛍光染色	72
第9項 統計解析	72
第3節 結果と考察	73
第1項 ヒト肺線がん細胞株 PC-9 における hLF-HSA の細胞内取り込 みに対するカベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害剤の影 響	73
第2項 ヒト肺線がん細胞株 PC-9 における細胞内小器官 pH 及び細胞 質 pH に対する hLF、HSA 又は hLF-HSA の影響	75
第3項 hLF-HSA による細胞内小器官のアルカリ化に対するカベオラ 依存性エンドサイトーシス阻害剤の影響	78
第4項 カベオラ依存性エンドサイトーシス活性剤を用いた hLF 又は HSA の細胞内導入による細胞内小器官 pH への影響	79
第5項 hLF-HSA による細胞内小器官のアルカリ化に対する NHE 阻 害剤の影響	81
第6項 hLF-HSA による細胞内小器官のアルカリ化及び増殖阻害に対 する NHE7 又は NHE1 ノックダウンの影響	82
第7項 hLF、HSA 又は hLF-HSA 処理による NHE7 又は NHE1 の発現 量への影響	86
第8項 hLF-HSA 及び NHE7 の細胞内局在	89
第9項 ヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 における細胞内小器官 pH に 対する hLF-HSA 及び NHE7 ノックダウンの影響	92
第4節 結言	94

第 4 章 結論	97
引用文献	100
著者目録	115
研究実績	116
謝辞	122

第1章 緒論

第1節 緒言

バイオ医薬品は人体に存在するタンパク質であることから、化学合成による低分子医薬品と比較して、副作用が低いことが証明されている。ヒトラクトフェリン (hLF)は抗腫瘍活性を持つ多機能性タンパク質であり、その作用からバイオ医薬品としての応用が期待されている [1, 2]。これまでに、薬物の血中安定性を向上させる方法として利用されているヒト血清アルブミン (HSA)融合技術に着目し、hLFのHSA融合タンパク質 (hLF-HSA)を作製した [3]。hLF単独と比較して、hLF-HSAは長い血中半減期を示した。また、様々な細胞に対する細胞増殖試験では、hLF単独と比較して hLF-HSA は、特にヒト肺線がん細胞に対して増強した増殖阻害活性を示した [3]。HSA融合は、主にHSAが活性化するカ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輸送する技術としても報告されている [4]。したがって、本研究ではhLF-HSAのヒト肺腺がん細胞に対する増殖阻害メカニズムを明らかにすることを目的に、その細胞内取り込みに焦点を当てた。本研究ではヒト肺腺がん細胞株PC-14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 hLF-HSA の抗腫瘍メカニズムとして、近年注目されているナトリウムイオン (Na^+) / プロトン (H^+)交換輸送体 (NHE) 7によるがんの細胞内小器官 pH 制御に焦点を当て [5]、その解明を目指す。

本章では、まず各章での主要な分子や技術などに関する既知の知見について概説する。さらに、各章における研究目的と意義について述べる。

第2節 ヒトラクトフェリン (hLF)

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 [6]。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 [1, 2, 7-9]。本研究では、hLF のもつ抗腫瘍活性に注目し、その創薬化を目指している。本節では、hLF の構造と細胞内取り込み、抗腫瘍活性に関する知見をまとめた。

第1項 hLF の役割及び構造

糖タンパク質であるラクトフェリン (LF)は、初めにウシ乳から発見され、後に母乳から鉄含有赤色タンパク質として精製され、約 80 年以上の月日が経った [10]。生体内で LF は、母乳中に最も多く含まれ、その濃度は初乳がピークであり、成熟するにしたがって低下する [11]。その後の研究で、LF は、唾液、涙、粘液などの体液にも存在することがわかってきた [6]。ウシ LF (bLF)は米国食品医薬品局 (FDA)によって安全であると認められた物質 (GRAS)として取り上げられている。そして、ヒト LF (hLF)はbLFとの高い配列相同性から、生物学的に同等であるとして分類されている。

LF はトランスフェリン (TF)と機能的及び構造的に類似しており、60%の配列同一性を有する [12]。LF はラクトトランスフェリンとしても知られ、TF ファミリーメンバーとして分類されている [13]。hLF は、691 アミノ酸の 80 kDa の単一のポリペプチド鎖で構成される鉄結合タンパク質であり、NローブとCローブと呼ばれる

2つの相同ローブからなる。相同ローブは約40%の配列同一性を共有し、それぞれが第二鉄 (Fe^{3+}) に可逆的に結合することが可能である (Fig. 1-1) [14]。

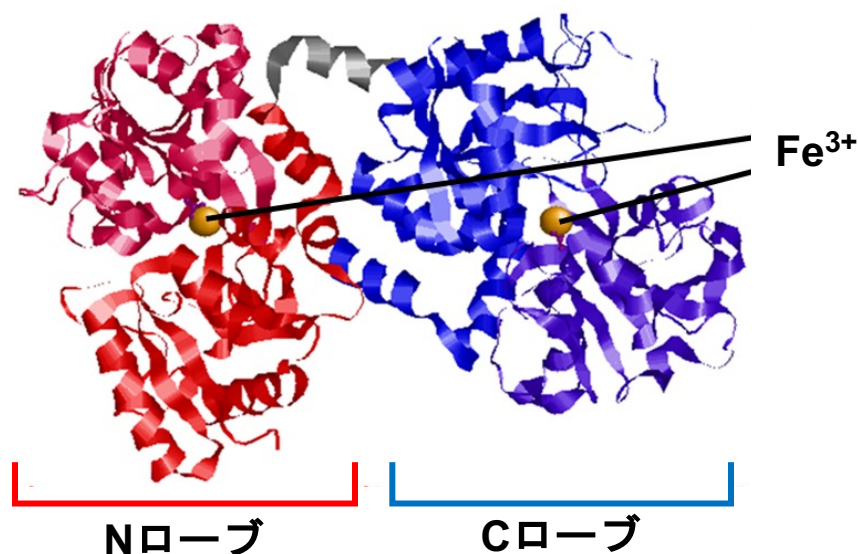


Fig. 1-1. 鉄飽和型 hLF の構造

Protein Data Bank (PDB ID: 1B0L)の X 線結晶構造解析をもとに RasMol を用いて作成した。

hLF は、その鉄含有量に応じて、2つの配座状態がある。鉄不飽和型 hLF (Apo hLF)はタンパク質構造的に開いた状態、鉄飽和型 hLF (Holo hLF)は閉じた状態になる [15]。生体内に存在する天然型の hLF は、約 10%~20%の鉄飽和率である。興味深いことに、鉄含有量は LF の物理的性質に影響を与えることが報告されている [16]。具体的には、Holo hLF は Apo hLF よりも安定であり、より高い熱安定性及びタンパク質分解消化に対する有意な耐性を有することが報告されている。

hLF はカチオン性タンパク質であり、特に N ローブは豊富な塩基性アミノ酸から構成される。N ローブには、ラクトフェリシン B (LFcin B; 17 から 41 アミノ酸残

基)とラクトフェランピン (268 から 284 アミノ酸残基)の 2つのペプチド配列がある [17]。これらのペプチド配列には、強力な抗菌、抗真菌、抗ウイルス、抗炎症や抗がん作用があることが報告されている [18-23]。

LF (hLF 及び bLF)は、がん細胞の細胞表面に豊富に含まれるグリコサミノグリカン (GAGs、主にヘパラン及びコンドロイチン硫酸)及びシアル酸と相互作用する [24-26]。hLF の 4つの連続したアルギニン残基 (G1RRRR)のクラスターを含む N 末端部分は、ヒト結腸がん細胞株 HT29-18-C1 及び Jurkat ヒトリンパ芽球性 T 細胞上の GAGs との相互作用に不可欠であることが示された [25, 27]。bLF の N 末端領域 (A1PRKN)も、hLF と同様に細胞膜関連 GAGs と相互作用することが確認されている [27]。さらに、Riedl らは、主に腫瘍細胞を構成する細胞質膜成分であるホスファチジルセリンが、ヒト Lfcin 誘導体の標的であることを示した [28]。これらの報告は、LF のがん特異性を説明できる可能性を示唆している。

第 2 項 hLF の抗腫瘍活性

hLF の抗腫瘍活性には、免疫賦活を介した間接的な抗腫瘍活性とがん細胞に対する直接的な抗腫瘍活性がある。本項では hLF のそれぞれの抗腫瘍活性に関する知見をまとめた。

2-1. 免疫賦活を介した間接的な抗腫瘍活性

1994 年に Bezault らが線維肉腫と黒色腫のマウスモデルにおける hLF の抗腫瘍活性に関するデータを示した [29]。さらに hLF の抗腫瘍活性は検証され、その腹腔内投与は、hLF の鉄飽和濃度とは無関係に、固形腫瘍の増殖と肺転移の両方を阻害す

ることが報告された。また、同報告では、hLF の抗腫瘍活性はナチュラルキラー (NK)細胞の活性化と相関していることが示された [29]。

内因性 hLF の発現は、様々ながん細胞株で検証され、そのすべてで hLF の顕著な発現抑制が示されている [30-32]。また、がん細胞における *hLF* 遺伝子の発現低下は、プロモーター及び遺伝子の高メチル化又は遺伝子配列の直接的な変化に関連していることが判明した [33-35]。Zhangらは、メチルトランスフェラーゼ阻害剤の使用による *hLF* 遺伝子発現の回復が、口腔扁平上皮がんのモデルにおけるがん細胞の増殖と転移を損なうことを示した [35]。これらの知見は、hLF の発現ががん細胞の生存において不都合である可能性を示唆している。

LF (hLF 及び bLF)は、腫瘍の予防及び治療の両方に対して抗腫瘍活性を発揮することが示されている [36, 37]。腫瘍に対する予防効果は、肺、舌、食道、肝臓、結腸直腸などのさまざまな動物モデルで実証されている [38-41]。さらに、治療効果については、がんの増殖、転移、腫瘍関連血管新生の阻害 [35, 42, 43]及び化学療法 の促進に有効であることが報告されている [44, 45]。

LF の免疫細胞を介した間接的な抗腫瘍活性は臨床試験でも検証されている。2002 年から 2006 年にかけて津田らは、国立がん研究センター中央病院での臨床試験において、ヒトの前がん性腺腫性結腸直腸ポリープの増殖に対する経口投与 bLF の抑制効果を検証した [46]。プラセボ群と比較して高投与群はポリープの成長が抑制される結果となった。bLF を投与した患者の血清 hLF 濃度及び好中球活性は有意に増加していた [46, 47]。さらに、獲得免疫の活性化と一致して、ポリープにおける NK 細胞活性及び CD4 陽性細胞数の増加が示された。この臨床試験は、がん治療における経口 LF 投与の有効性を示す極めて重要な報告である。

全体として、LF は、その高い免疫賦活活性から、がんの予防及び治療において様々な研究がなされている。

2-2. がん細胞に対する直接的な抗腫瘍活性

hLF は細胞内に取り込まれることで多くの活性を示すと考えられている。ここでは、LF の抗腫瘍活性に関する知見をまとめた。

LF のがん細胞に対する直接的な抗腫瘍活性は、その標的細胞の表面の特定の LF 受容体 (LFR) に依存する。LFR 研究は盛んに行われており、主なものとして、LDL 受容体関連タンパク質 (LRP-1) [48, 49] やインテレクチン-1 [50] などがある。

がん細胞に LF (hLF 及び bLF) を高濃度処理 (125 μ M) することで、細胞周期の停止やアポトーシスの誘導といったがん細胞に対する LF の直接的な抗腫瘍活性が報告されている [51-54]。LF による細胞周期の停止やアポトーシスの誘導は、LFR を介した様々な細胞内シグナル伝達経路の関与が報告されている [51-54]。細胞周期の停止に関しては、Xiao らによって、LF がヒト頭頸部がん細胞に対して、G1 サイクリン依存性キナーゼの発現量を低下させ、細胞周期を停止させることが報告されている [55]。また、LF はヒト口腔扁平上皮がん (OSCC) の p53 の活性化を誘導し、G1/S 期での細胞周期の停止を誘導することが報告されている [56]。アポトーシスの誘導に関しては、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 の培地に LF を添加すると、G1/S 移行における細胞周期停止が誘導されることが示された [57]。また、LF は OSCC に対して Akt 活性化を抑制し、mTOR/S6K 経路と JAK/STAT3 経路を介して、アポトーシスの誘導を促進した [56]。さらに、ヒト肺腺がん細胞株 A549 に対して、LF は Bcl-2 の発現低下と Bax の発現増加を誘導し、Caspase-3 の発現を向上させ、アポトーシスを誘導することが報告されている [58]。ヒト白血病 T 細胞由来の

Jurkat 細胞では、PARP-1 と Caspase-7 の切断を誘導し、JNK 関連 Bcl-2 経路を介してアポトーシスを誘導する [59]。しかし、LF による細胞周期の停止やアポトーシスの誘導は高濃度 (88-125 μM)での検討であったため、LF のがん細胞に対する直接的な抗腫瘍活性は決して高くはないと推察される [1, 51, 54]。また、LF の細胞内取り込みと抗腫瘍活性に関係する直接的な証拠を示す文献はなかった。このことから、LF をバイオ医薬品として展開するためには、その活性を高める方法を見出す必要がある。本研究では、HSA を融合した hLF の増殖阻害活性が増強したことから、その細胞内取り込み促進の可能性に着目した。

第 3 項 hLF の細胞内取り込み

LF は主に LFR を媒介したクラスリン依存性エンドサイトーシスによって、ヒト結腸がん細胞株 Caco-2 [60, 61]やヒト骨肉腫細胞株 SaOS-2 [62]などの細胞に取り込まれることが報告されている。クラスリン依存性エンドサイトーシスの分子機構を Fig. 1-2 に示す。クラスリン依存性エンドサイトーシスは、LFR とそのリガンドである LF が結合し (Fig. 1-2A①)、アダプタータンパク質 (AP) の 1 つである AP-2 が細胞膜上に集積し (Fig. 1-2A②)、この AP-2 に引き寄せられたクラスリンが集積 (Fig. 1-2A③)、クラスリン被覆ピットが形成され (Fig. 1-2B)、小胞がダイナミンにより切断され遊離する (Fig. 1-2C)、という工程から成り立っている [60]。

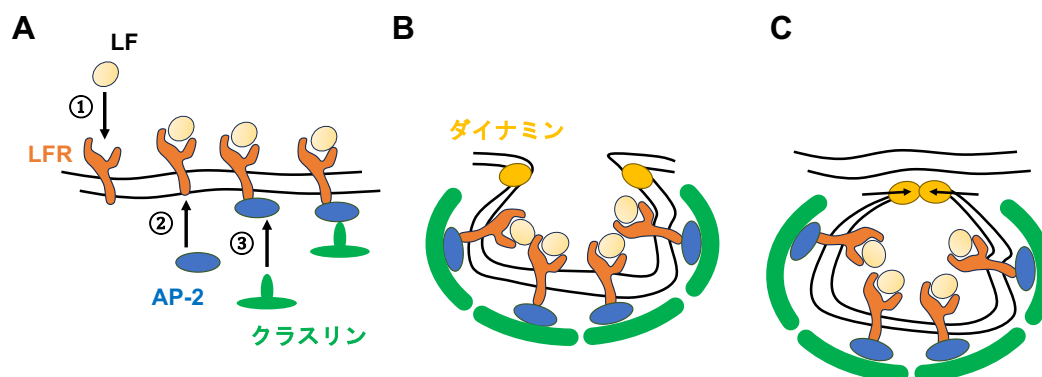


Fig. 1-2. クラスリン依存性エンドサイトーシスによる LF の細胞内取り込み

わずか 1 つの報告ではあるが、hLF はカベオラ依存性エンドサイトーシスを介してヒト単球性白血病細胞株 THP-1 に取り込まれる [63]。カベオラは細胞膜に存在するコレステロールやスフィンゴ脂質に富む脂質ラフトであり、細胞内シグナル伝達や膜輸送に関与している [64]。カベオラ依存性エンドサイトーシスによる物質の細胞内取り込みは前述したエンドサイトーシスと同様にダイナミン 2 に依存するが、クラスリンには依存しない。カベオラ依存性エンドサイトーシスは HSA の取り込み経路として報告されており [65]、カベオラ依存的な HSA の取り込み機序に関する詳細は、第 1 章 第 3 節 第 4 項 に示す。

LF の細胞内動態には、細胞内小器官や細胞核への移行、分解、細胞外への再放出など様々な報告があるが、細胞内に取り込まれた LF の機能を解明した研究報告は少なく、今後の発展が期待されている。前述したように、LF の抗腫瘍活性及び細胞内取り込みは LFR に依存している。したがって、カベオラ依存性エンドサイトーシスのような LFR に依存しない細胞内取り込みを活性化することで、LF の抗腫瘍活性を高める可能性がある。

第3節 ヒト血清アルブミン (HSA)

ヒト血清アルブミン (HSA)は血中に最も豊富に含まれるタンパク質であり、抗原性が少なく、長い血中半減期を有する [66, 67]。HSA には、アミノ酸や長鎖脂肪酸、イオン、亜鉛、銅、カルシウムなど様々なリガンドが結合できる結合ポケットが多くあるため、薬剤と非特異的に結合できることが報告されている。また、HSA の表面に位置する 34 位の遊離アミノ酸システインには、薬剤と共有結合できるチオール基が存在する [68]。さらに、がん細胞に集積することから、薬物のドラッグデリバリーシステム (DDS)のキャリアとして実用化されている [69]。本研究では、hLF に HSA を融合することで hLF のがん細胞に対する集積性が高まり、その抗腫瘍活性が増強したのではないかと考えた。本節では HSA の特性に関する知見をまとめた。

第1項 HSA の血中安定性

細胞はタンパク質などの栄養分を非特異的なピノサイトーシスにより細胞内に取り込む。細胞内に取り込まれた一般のタンパク質は、初期エンドソームへと輸送され、後期エンドソームを経て、最終的にリソソームと融合することで内容物 (タンパク質)は分解される。しかし、HSA や HSA 融合タンパク質は、初期エンドソーム (pH 6.0)で胎児性 Fc 受容体 Neonatal Fc Receptor (FcRn)と pH 依存的 (pH 6.0)に結合し、リサイクリングエンドソームへと輸送され、リソソームで分解されずに再び細胞表面に移送される (Fig. 1-3B)。そして、pH 7.4 である血中で解離され、再放出される。このリサイクリング機構により HSA は 19 日間という長い血中半減期を持ち、薬剤の血中安定性の向上に利用されている [66, 67, 70]。このいわゆるリ

サイクルが成立すると、がん細胞はアミノ酸源として HSA を利用することが困難になる。そこで、多くのがん細胞では FcRn の発現を低下させるか、消失させて、これに対応している [71]。一方、FcRn の発現量を向上させることで、増殖を促すがん細胞も存在する。第 1 章 第 3 節で述べたように、HSA はアミノ酸などの多くの分子と結合する。FcRn 高発現によるリサイクリング機構の活性化によって、HSA に結合した細胞外のアミノ酸をアミノ酸源として確保するためであると推測されている [72, 73]。

このように、細胞内に取り込まれたタンパク質の局在を示すことは、その細胞機能を明らかにするための重要なアプローチである。細胞内小器官ごとに特有のタンパク質 (細胞内小器官マーカー) が報告されており、それらは免疫染色法において細胞内小器官を特異的に標識するための強力なツールとして利用されている。エンドソームの細胞内小器官マーカーとしては、Rab5 (初期エンドソーム) [74, 75]、Rab7 (後期エンドソーム) [74] や Rab11 (リサイクリングエンドソーム) [76] などが利用されている。エンドソームマーカーの局在と役割に関しては、Fig. 1-3 と Table. 1-1 [74-76] に示した。

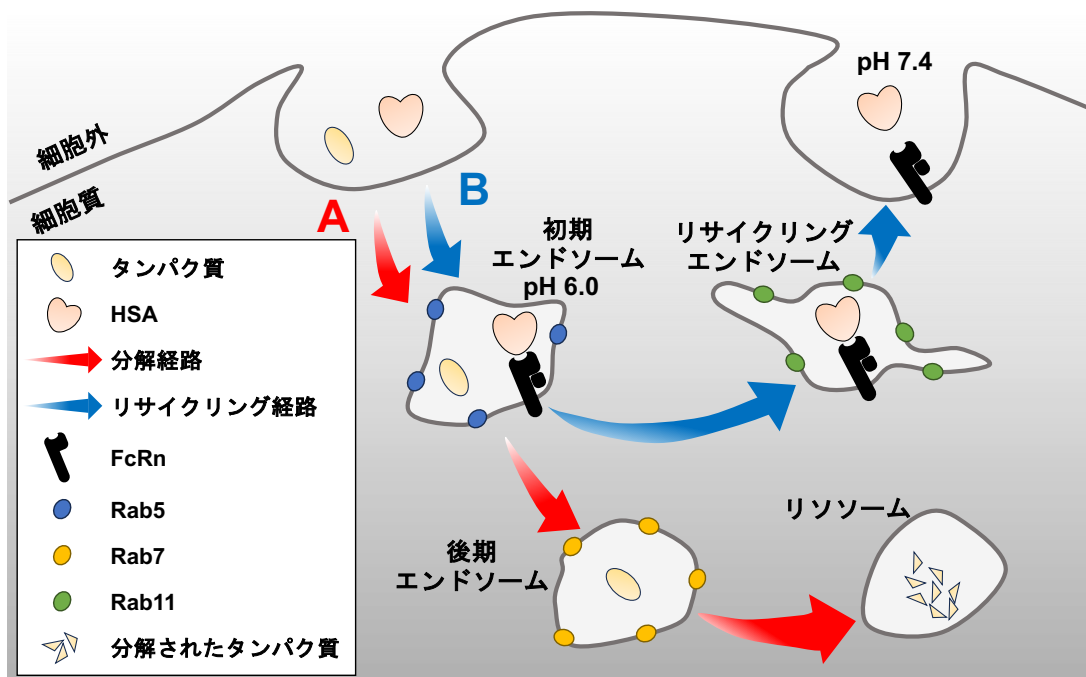


Fig. 1-3. FcRn を介した HSA のリサイクリング機構と
リソソームを介したタンパク質分解

Table. 1-1. エンドソームに対する細胞内小器官マーカーとその機能

細胞内小器官	細胞内小器官マーカー	役割
初期エンドソーム	Rab5	Rab5は初期エンドソームに局在し、クラスリンで覆われた小胞の初期エンドソームへの融合および初期エンドソーム間の融合を制御する。
後期エンドソーム	Rab7	Rab7は後期のエンドソームに局在し、さまざまなタンパク質間相互作用カスケードを介したエンドソーム-リソソーム輸送を制御する。
リサイクリングエンドソーム	Rab11	Rab11はリサイクリングエンドソームに局在し、ホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸及びホスファチジン酸に優先的に結合し、エンドソームリサイクリング区画から細胞膜への小胞の輸送の調節に作用する。

第2項 HSA のがん組織での働き

血中に存在するアルブミンは、血管内皮で発現する gp60 と呼ばれるアルブミン受容体を介して血管内皮バリアーを通過する。ただし、健康個体では、アルブミンは連続内皮型血管をほとんど透過できず細胞内に取り込まれない。一方、がん個体では、組織での血管透過性が著しく亢進するため、アルブミンなどの高分子体が血管から浸潤しやすく、またリンパ系の未発達も加わり、アルブミンががん組織に到達し易い環境にある [77]。これを EPR 効果 (Enhanced Permeation and Retention effect) という。多くのがん組織中の間質細胞で、アルブミン結合タンパク質 (secreted protein acidic and rich in cysteine、SPARC) が高発現することが知られている [78]。SPARC は、アルブミンと結合することで、アルブミンががん組織への接近し、取り込まれると考えられる。

第3項 がん細胞での HSA の代謝様式

がん細胞は、その速い増殖を維持するために栄養分が必要であり、代謝が正常細胞と異なることが知られている。細胞の増殖シグナルに関連する Ras タンパク質の遺伝子に変異が生じて、恒常的にシグナルが活性化する変異型 *Ras* 遺伝子がん細胞は主にグルタミンを主要アミノ酸として使用する [79]。がんにおける *Ras* 遺伝子変異の頻度に関する最近の報告によると、ヒトのがん全体の約 20% が、*Ras* 遺伝子 (K、N、H *Ras*) に変異を有しており [80]、膵臓がんや結腸がん、肺がんのそれぞれ 88%、55%、33% が *Ras* 遺伝子変異型がん細胞である。変異型 *Ras* 遺伝子がん細胞は、生産効率の低い解糖系を用いて ATP を産生し (ワーバーク効果)、糖代謝と関連するグルタミンを多く消費する [81, 82]。しかし、それだけではがん細胞の

成長維持は難しい。がん細胞がアミノ酸枯渇環境下で増殖する場合には、オートファジーと呼ばれるタンパク質分解機構を活性化し、細胞外に多く存在するアルブミンなどを非特異的にマクロピノサイトーシスを介して細胞内に取り込む。細胞内に取り込まれたアルブミンはリソソームで分解され、アミノ酸源として利用される [79]。また、血管から離れている為に十分な栄養を得るのが難しいとされる変異型 *Ras* 遺伝子の膵臓がんにおいても、マクロピノサイトーシスを介した HSA の細胞内取り込みにより、HSA をアミノ酸源として利用していることが報告されている [83]。

第 4 項 HSA の受容体を介した薬物送達促進

ヒトのがん全体の約 80% を占める野生型 *Ras* 遺伝子がん細胞は、主にカベオラ依存性エンドサイトーシスによって HSA を細胞内に取り込む [84]。このエンドサイトーシスは、HSA とその細胞表面受容体 gp60 との直接的な相互作用によって引き起こされる [85]。

カベオラ依存性エンドサイトーシスは、アルブミンと細胞膜上に存在するその受容体である gp60 との結合を介して、Src ファミリーチロシンキナーゼシグナル伝達を活性化 (Src Y416 の自己リン酸化) することにより開始される。カベオリン-1 (caveolin-1、Cav-1) は、エンドサイトーシスを担うシグナル伝達機構の足場機能を果たし、細胞膜でカベオラを安定化するための中心的な役割を果たす (Fig. 1-3. A)。Src ファミリーチロシンキナーゼは、Cav-1 (Y14) とダイナミン-2 (Y231、Y597) のチロシン残基をリン酸化する (Fig. 1-4. B)。これにより、カベオラの分裂及びアルブミンの細胞内取り込みが起こる (Fig. 1-4. C) [4]。

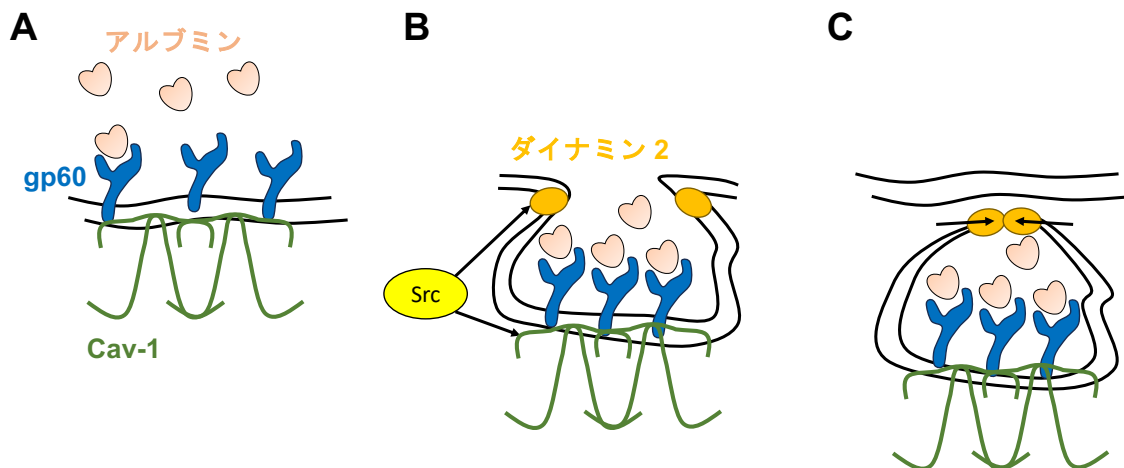


Fig. 1-4. HSA のカベオラ依存性エンドサイトーシスによる細胞内取り込み

第 5 項 HSA を応用した抗がん剤

前述したように、HSA は *Ras* 遺伝子変異の有無にかかわらず、あらゆるタイプのがんへ送達されることから汎用性の高い薬物送達のキャリアとしての応用が期待される。

現在、アルブミンベースの抗がん剤は FDA によって 2 品目承認されている。アルブミン製剤であるアルブミン結合懸濁型パクリタキセル製剤 (nab-パクリタキセル、Abraxane) は、2005 年に FDA によって承認された [69, 86]。Abraxane は、乳がんや胃がん、非小細胞肺癌 (NSCLC)、膵臓がんに対して高い細胞毒性を示す [87, 88]。Abraxane の開発によって、患者へのステロイドや抗ヒスタミン剤などの投与が不要となり、患者への負担が減り、高用量の投与が可能となったため、臨床試験での奏効率が向上した。Abraxane の作用機序として、アルブミンが誘導する Cav-1 を介したカベオラ依存性エンドサイトーシスの関与が示唆されている [4]。最新の研究では、Abraxane は、変性アルブミン特異的に結合する受容体によってエンドサイトーシスが誘導される可能性が報告された。これは Abraxane 由来の A

アルブミンが製造工程で使用されている有機溶媒によって変性した可能性が推察されている。もう一つ新しいアルブミン製剤としてアルブミン結合懸濁型シロリムス製剤 (nab-シロリムス、Fyarro)がある。Fyarro は 2021 年に FDA によって承認され、局所進行切除不能または転移性の悪性血管周囲類上皮細胞腫瘍を対象に使用されている [89]。HSA 結合懸濁型製剤の場合、HSA 単独よりも高分子であるため、前述した EPR 効果が働くことが考えられている [77, 90]。

第 4 節 hLF と HSA との融合タンパク質 (hLF-HSA)

様々な生理活性を有する多機能性タンパク質である hLF と、薬物送達技術に利用されている HSA との融合タンパク質を開発している [3]。発現する融合タンパク質は、融合するアミノ酸末端配列の違いにより、その性質に差異ができることが報告されている [91-96]。したがって、hLF の C 末端側に HSA を付加した hLF-HSA 及び hLF の N 末端側に HSA を付加した HSA-hLF が作製された (hLF/HSA) (Fig. 1-5)。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) DG44 細胞で産生された hLF/HSA は、Holo 型である。hLF-HSA は、HSA-hLF と比較して、腸管細胞モデル (Caco-2 細胞)における安定な取り込みと放出プロセス、並びに高い熱安定性及び消化性分解抵抗性を示す。この差異は、hLF の N 末端への HSA 融合による立体障害によるものと考えている。hLF-HSA は、Holo hLF (19.5 分)と比較して、長い半減期 (64.0 分)を示す。また、*in vitro* で、hLF/HSA の低濃度処理 (5 から 10 μ M)は、ヒト肺腺がん細胞に対して増強した増殖阻害活性を示し、その一方で、正常細胞に対しては示されないことが見出された。それらの増殖阻害活性の増強は、同じ濃度の hLF 単独又は HSA 示されなかったことから、hLF に HSA を融合したことによる相乗効果による

ものであると考えている。さらに、hLF-HSA ががんの遊走を強力に阻害することを見出している [97]。具体的には、がん細胞の遊走及び転移の促進に関与するマトリックスメタロプロテイナーゼ-1 (MMP-1)に発現を抑制することが示された [97]。また、興味深いことに、hLF-HSA はヒト正常肺細胞に対して、増殖阻害活性を示さないことが見出されている。しかし、hLF-HSA のがん細胞に対する遊走阻害及びがん細胞選択性のメカニズムに関しては不明な点があり、今後の研究が望まれる。

以上のように、hLF-HSA は、がん細胞に対して優れた抗腫瘍活性を有することから、バイオ医薬品として期待される。しかし、hLF-HSA の抗腫瘍活性メカニズムに関しては、不明な点が残されている。なお本研究では、安定性が高く生産効率の高い hLF-HSA (Holo 型)を使用する。

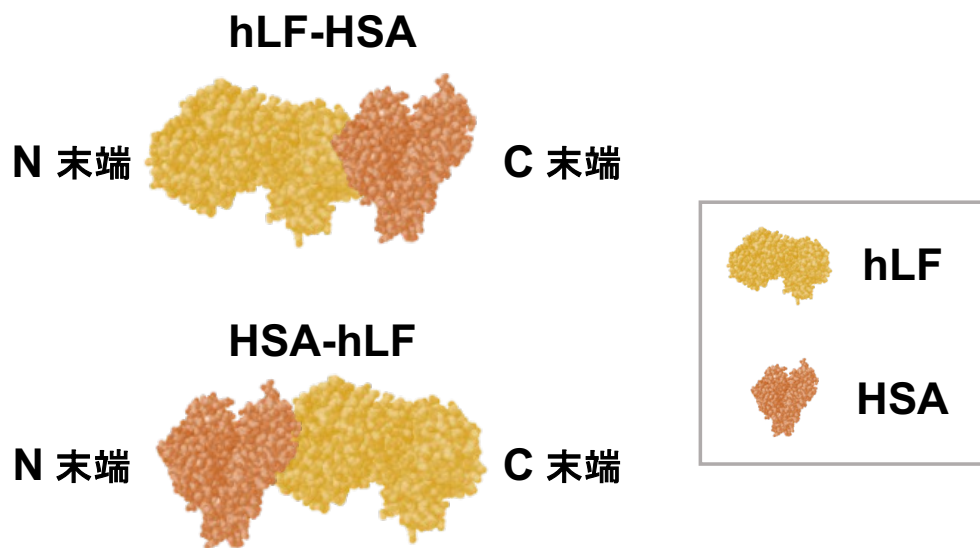


Fig. 1-5. hLF/HSA (hLF-HSA 及び HSA-hLF) 融合タンパク質

第5節 がんの増殖と pH

正常細胞の細胞外 pH は 7.4 前後に厳密に制御されている。第1節第3節第2項に前述したように、がん細胞はワーバーグ効果によって ATP を産生しその増殖を促す [81, 82]。その過程で、解糖系を介して乳酸とプロトン (H^+) が産生され、 H^+ が細胞外に放出されることで細胞外 pH が 6.5 前後と大きく酸性化する (Fig. 1-6) [98]。1990 年代から 2000 年代にかけて、このようながん細胞を取り巻く酸性環境は、がんの増殖や浸潤、転移に深く関わっていることが報告されてきた。具体的には、腫瘍血管新生に関与する VEGF やインターロイキン-8 などの発現を誘導することでがんの増殖に寄与することや、遊走及び転移の促進に関与する MMP2 及び MMP9 などのプロテアーゼの発現亢進によりがん細胞の遊走を促進することが報告されている [98-100]。がん細胞が H^+ を細胞外に放出する機構は不明であったが、がん細胞は細胞膜上の H^+ 輸送にトランスポーターやポンプ、チャネルなどの輸送タンパク質を利用することが報告されている。特に細胞膜上に発現する細胞膜型 Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE) が H^+ を細胞外に放出し、細胞質のアルカリ化とそれに付随して、細胞外の酸性化を維持していることが明らかになった [101, 103]。多くの研究者は、このような正常細胞とがん細胞との pH 環境の差異に着目し、がんの pH をターゲットとした治療を目指しており、盛んに研究が行われている。細胞内小器官 pH に関しては、それぞれ固有の酸性 pH があり、正常細胞及び腫瘍細胞の増殖に重要である [104]。この pH 勾配は、細胞内小器官に特異的な酵素の至適条件を満たす他に、細胞内小器官を介した物質輸送システムである膜交通 (メンブレン trafficking) に非常に重要である [105]。細胞内小器膜型 NHE はその pH 恒常性に

関与していることが報告されており新たながん治療の標的として注目されている [5]。本項では、がんとその細胞内 pH 制御に関する知見をまとめた。

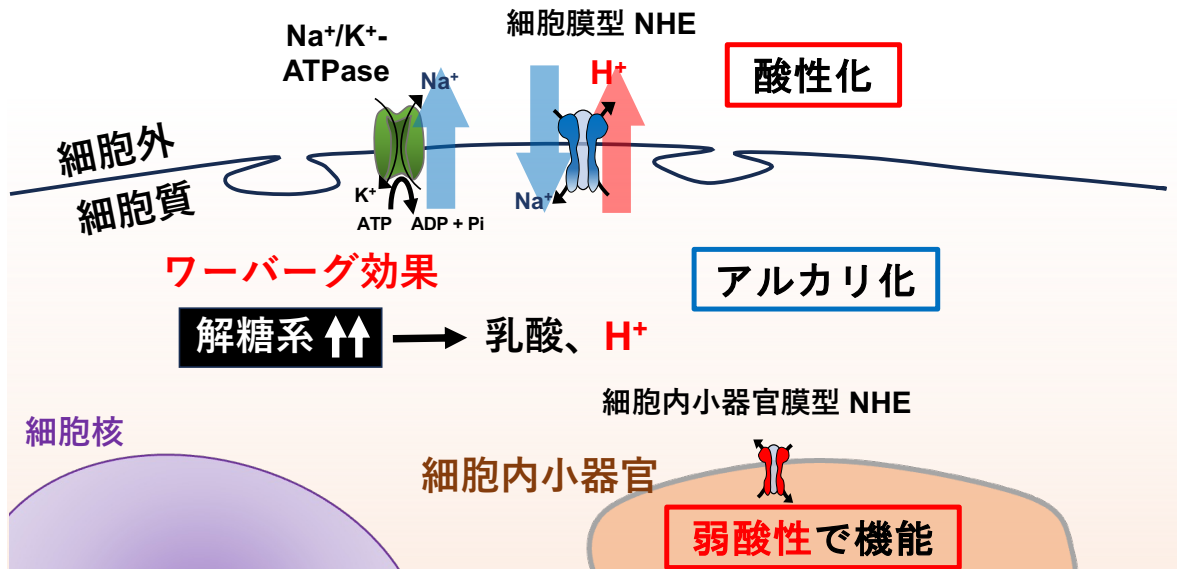


Fig. 1-6. がん細胞における細胞外及び細胞内の pH 環境

第 1 項 プロトン (H⁺) の受動輸送と能動輸送

がん細胞は、アルカリ性の細胞質 pH を維持するために、細胞質から H⁺ を除去する恒常性維持機構を進化させてきた [102]。このような pH 制御には、H⁺ を生体膜を横断して輸送するトランスポーターやポンプ、チャネルが関与している。イオン輸送タンパク質は生体膜上に局在し、選択的にイオンを内部にローディング、あるいは外部に排出することにより、イオンや pH 環境を調節する。イオン輸送には、受動輸送と能動輸送がある。受動輸送は選択的にイオンを電気化学的なイオン勾配の方向に沿って輸送する。この種類の輸送はイオンチャネルや促進拡散/輸送のトランスポーターである。対照的に能動輸送は、エネルギーを必要とし、低い濃度から高い濃度側へとイオンの輸送が可能である。能動輸送は、光や ATP をエネ

ルギーとして利用する一次性能動輸送体とイオン(基質)の濃度勾配の差を利用する二次性能動輸送体は大別される。二次性能動輸送体はさらに2つに分類され、異なる基質を同じ方向に輸送する共輸送体と対向に輸送する交換輸送体がある。

第2項 細胞内小器官 pH 恒常性モデル

前述したように、細胞内小器官 pH は、がんの増殖に大きく影響する。細胞内小器官の酸性化には、一次性能動輸送体である V-ATPase が関与している。V-ATPase は、細胞内小器官膜に局在し、細胞内小器官に特異的なアイソフォームが6種類報告されている [106]。V-ATPase の研究は広く進められており、その阻害により、細胞内小器官 pH はアルカリ化され、メンブレントラフィックに異常が起きることが示されている [107]。V-ATPase は、サイトゾル内の ATP を加水分解し、細胞内小器官内への H⁺を輸送する (Fig. 1-7) [108]。しかし、正に荷電した H⁺の移動により、反対の膜電位が生成され、V-ATPase の機能が停止し、細胞内小器官内の酸性化に必要な H⁺の蓄積が妨げられる。K⁺などのカチオンの細胞質への輸送や、Cl⁻などのアニオンの細胞内小器官への輸送によって電位が分流され、pH 勾配の形成が可能になっている。がん細胞における V-ATPase の発現量増加は、ワーバーク効果、がんの悪性化などに関連しており、研究が進められている [109, 110]。しかし、細胞内小器官の特異的な pH を保つことは、V-ATPase のような H⁺ポンプだけでは説明できないため、そのカウンターパートとして、細胞内小器官膜型の Na⁺/H⁺交換輸送体 (NHE)が関与していると推測されている (Fig. 1-7)。

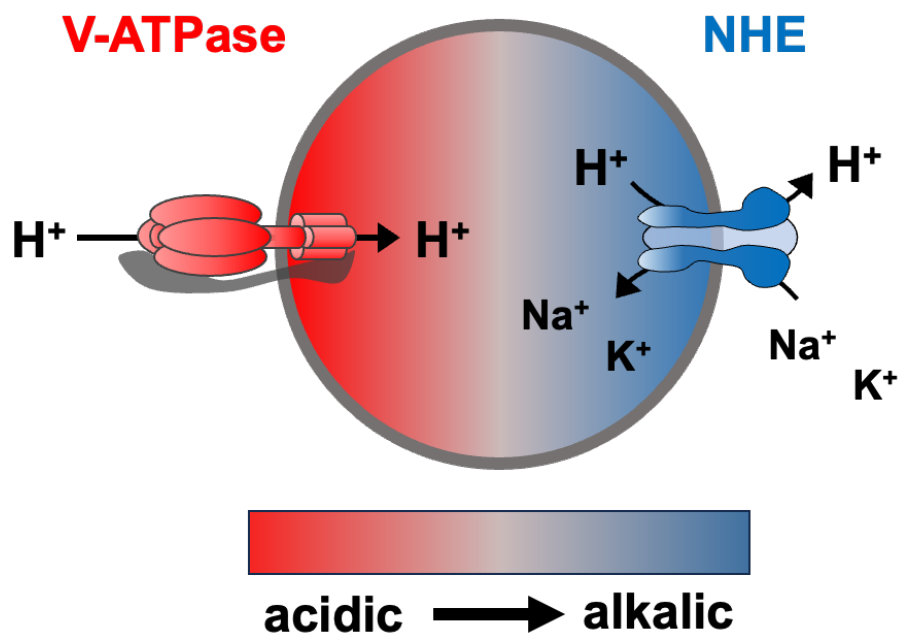


Fig. 1-7. H^+ ポンプによる細胞内小器官 pH の恒常性

第 6 節 Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE)

二次性能動輸送体である NHE は、細胞質と細胞内小器官の pH 制御に重要な役割を果たす交換体であり、 Na^+ 又は H^+ 勾配を駆動力としてその反対方向にイオンを輸送する。NHE には、細胞膜に局在する NHE (細胞膜型 NHE)と細胞内小器官膜上に局在する NHE (細胞内小器官膜型 NHE)が存在している (Fig. 1-8) [111]。細胞膜型 NHE は一次性能動輸送体である Na^+/K^+ -ATPase によって形成される Na^+ の勾配を駆動力とし、細胞内小器官膜型 NHE は V-ATPase と共に細胞内小器官の pH 制御に関わると推測されている。また、細胞内小器官膜型 NHE は、 Na^+ の勾配だけでなく細胞質に豊富に含まれる K^+ も駆動力に H^+ を細胞外へ排出することができる [111]。本項では、NHE の生理的役割や最新の知見をまとめた。

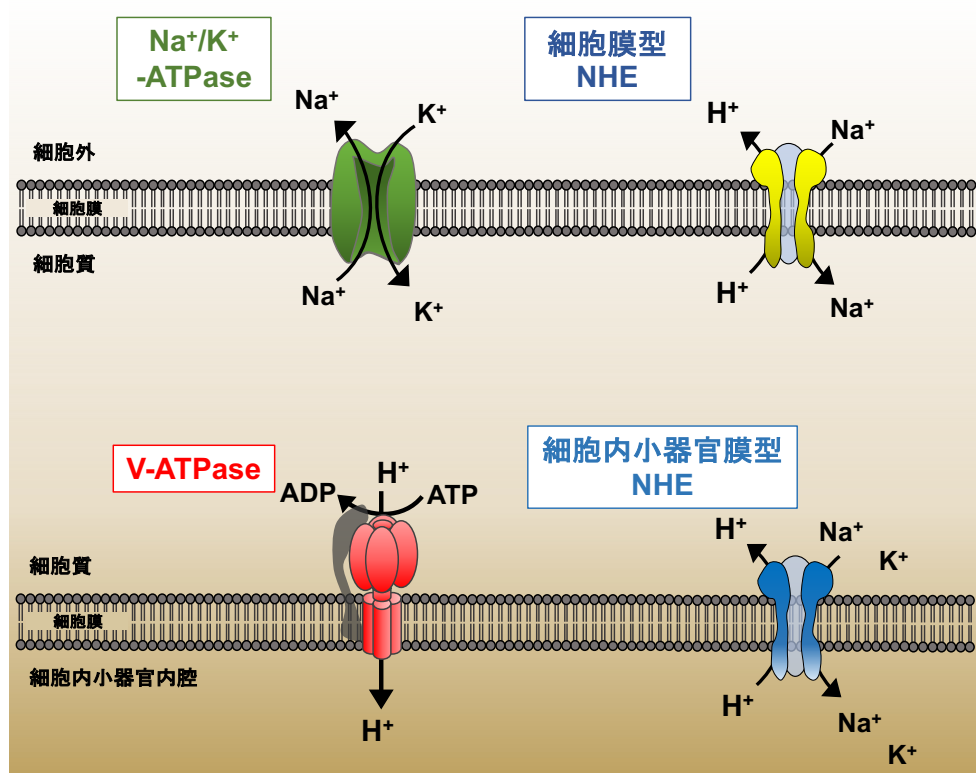


Fig. 1-8. 細胞膜型 NHE と細胞内小器官膜型 NHE

第1項 NHEのアイソフォームと細胞内局在

ヒト *NHE* 遺伝子は、*SLC9* ファミリーとされ、11種類が報告されている [112]。*NHE1* から 9 は塩基配列の相同性が高く、*NHE10* 及び *11* は、相同性が低いため、分子進化上は遠縁にあたと想定される。全ての *NHE* は、特徴的な2つの領域から成る (Fig. 1-9)。N 末側の推定 10~12 回の膜貫通ヘリックスからなる疎水性領域 (約 450 から 50 アミノ酸残基) と、C 末側の親水性領域 (約 10 から 450 アミノ酸残基) である。疎水性領域はイオン輸送路を形成している。C 末側親水性領域は、アイソフォーム間でそのアミノ酸配列に多様性があり、異なる相互作用因子が報告されている [113-115]。*NHE1* から 9 タンパク質は、前述したように細胞内局在に基づいて2種類に分類される (Fig 1-8)。*NHE1* から 5 は細胞膜型 *NHE* であり細胞膜に、*NHE6* から 9 は細胞内小器官型 *NHE* でありそれぞれゴルジ体やエンドソームなどの複数の細胞部位に局在している (Fig. 1-10) [116-119]。

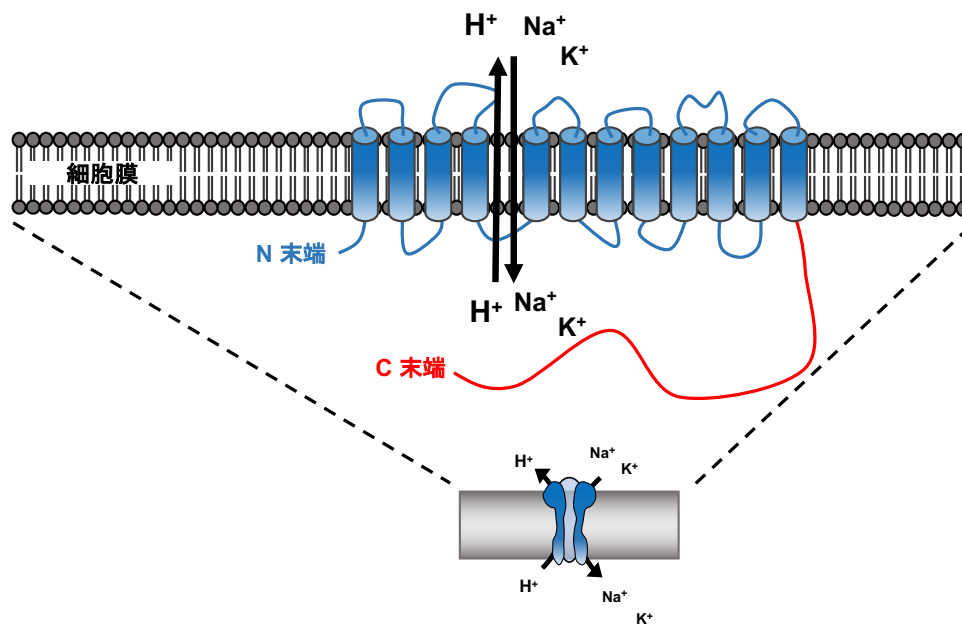


Fig. 1-9. NHEの2次構造モデル

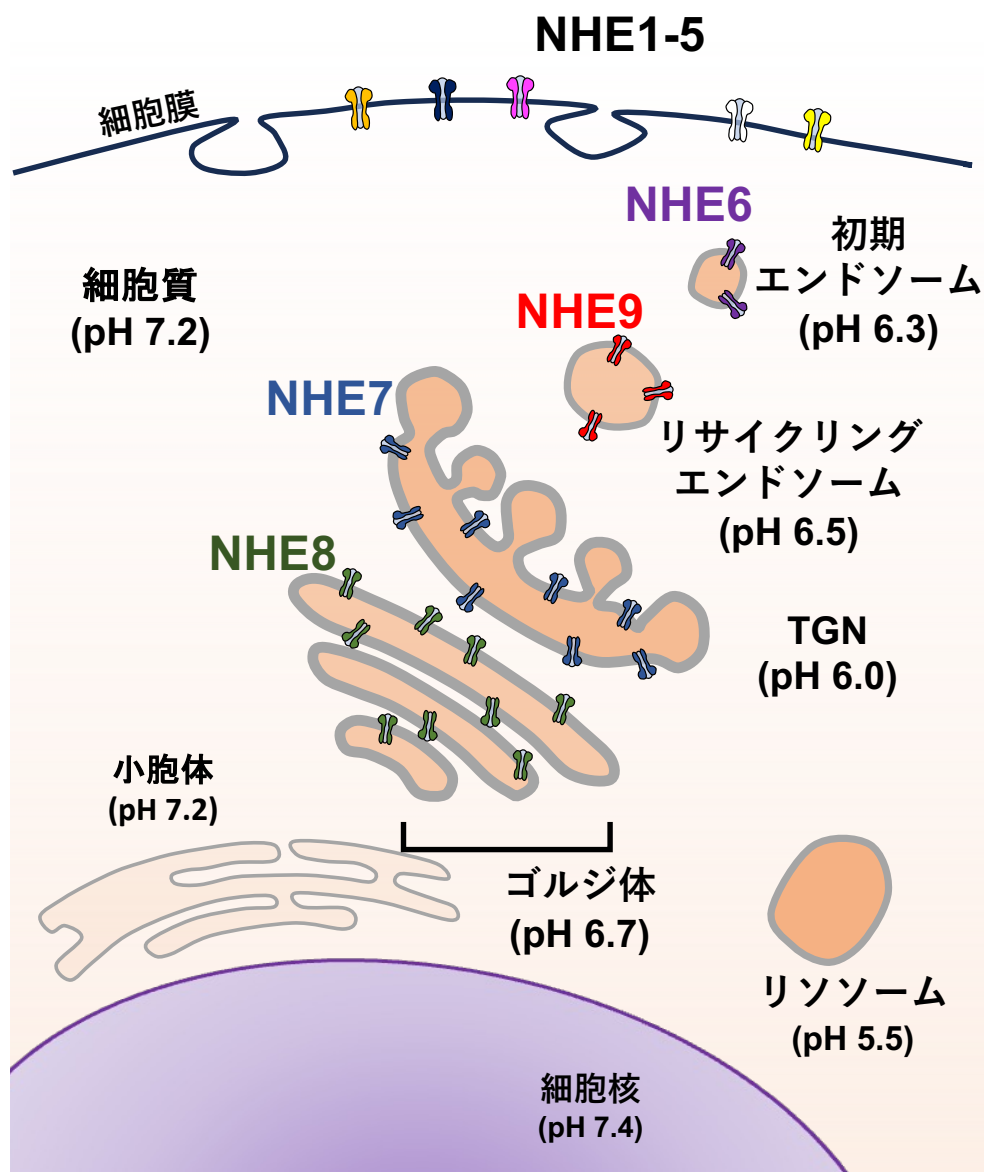


Fig. 1-10. NHE の局在と細胞内小器官 pH

第2項 細胞内小器官膜型 NHE による細胞内小器官 pH 制御

がん細胞における NHE1 の研究は先行しており、第1章第5節で記したように、細胞膜上に局在する NHE1 は、解糖系の代謝産物である H^+ を細胞外に放出することで、細胞内のアルカリ化及び、それに伴い細胞外の酸性化を担っている。そうすることで、がんの増悪化や浸潤、転移の促進を促している [120]。細胞内小器官膜型 NHE は、一般的に細胞内小器官内の H^+ を細胞質に放出することで、細胞内小器官をアルカリ化することが数多く報告されている [121]。これは細胞内小器官膜型 NHE (NHE6、7、9) をノックダウンすることで細胞内小器官が酸性化され、過剰発現させることでアルカリ化されることで示されている [116, 119]。しかし、細胞内小器官膜型 NHE に関する研究は、細胞膜型 NHE に比べ進んでいないのが現状である。

第3項 細胞内小器官膜型 NHE7 による細胞内 (細胞内小器官及び細胞質) pH 制御

NHE7 は、2001 年に沼田らによってクローニングされ、主に細胞内小器官であるトランスゴルジ網 (TGN) に局在していることが特定された (Fig. 1-10) [121]。そして、NHE7 は、細胞内小器官膜を越えて H^+ と引き換えに Na^+ 又は K^+ を輸送可能な最初の細胞内小器官膜型 NHE として同定された [121]。NHE7 は様々な疾患に関与しており、アルツハイマー病 [122] や X 連鎖精神遅滞隣接遺伝子シンドローム [123] としての標的遺伝子として同定されている。2008 年に沼田らによって乳がん MDA-MB-231 細胞における NHE7 結合タンパク質のグループが同定され、それらががん細胞内で機能的ネットワークを形成し、細胞接着、腫瘍の進行を調節する可能性がある構成要素として報告された [124]。そして 2011 年には、乳がん MDA-MB-231 細

胞を使用した *in vivo* での検証で、NHE7の過剰発現により、その細胞接着、足場非依存性増殖、腫瘍形成を促進することが示された [125]。近年、Commissoらによって NHE7 は、膵臓がん細胞の TGN の酸性化の維持に関与していることが報告された [5]。この報告は、前述した細胞内小器官膜型 NHE の報告とは対照的であり、組織特異的に NHE による H^+ の輸送方向が異なる可能性が示唆されている (Fig. 1-11) [5, 126]。ヒト膵臓がん細胞における NHE7 のノックダウン (機能抑制) は、TGN のアルカリ化に付随して、細胞質 pH を酸性化をもたらした [5]。更に、膵臓がん細胞における NHE7 の機能抑制は、その増殖を抑制し細胞死を誘導した。一方、非形質転換細胞 (正常細胞) に対しては、細胞内 pH の恒常性及び細胞増殖への影響は認められなかった。このことから、NHE7 は創薬ターゲットとして非常に注目されている。しかしながら、NHE7 の生物学的な意義や機能に関しては、不明な点が多く残されている。したがって、NHE7 の活性剤及び特異的な阻害剤が発見されることで、創薬としての更なる理解に繋がると考えられる。

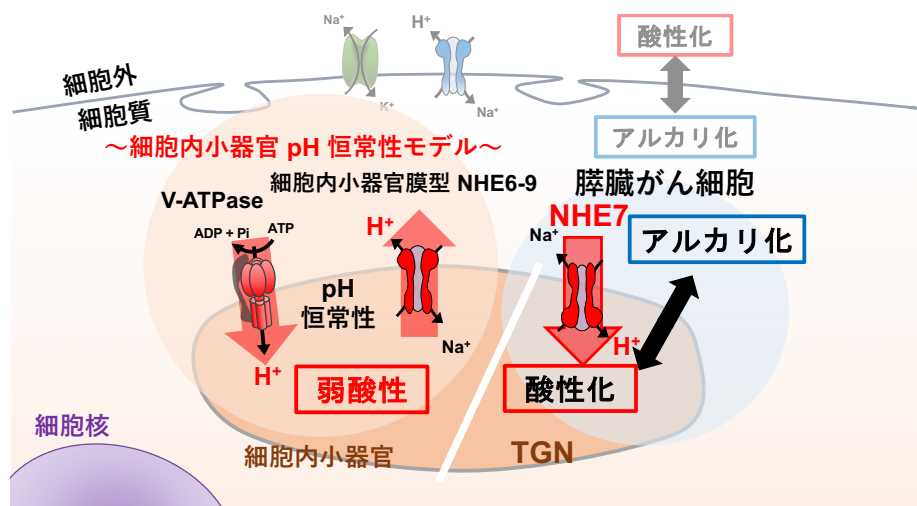


Fig. 1-11. 細胞小器官膜型 NHE7 の各がん細胞株における H^+ 輸送モデル

第7節 ゴルジ体

ゴルジ体は、細胞内で合成されたタンパク質の修飾 (糖鎖付加、脂質付加、リン酸化など)や膜輸送機構、細胞増殖、がんの遊走に関わる細胞内小器官である [98-100, 120]。タンパク質の修飾及び輸送機構は、正常な細胞も含め、細胞内小器官がそれぞれの機能を果たすために必要不可欠である。本項では、ゴルジ体の全体的な役割や NHE7 が主に発現している TGN に関する知見をまとめた。

第1項 ゴルジ体の構造及び役割

ゴルジ体には、複数の嚢と呼ばれる扁平な袋状の膜が積み重なった構造 (層板構造)があり、その両端には管状や袋状のつながった網目状構造がある (Fig. 1-12) [127]。ゴルジ体のタンパク質輸送には極性があり、輸送するタンパク質 (積荷タンパク質)を受け取る側をシス、送り出す側をトランスという。ゴルジ体の層板には、シス側にシス嚢、トランス側にトランス嚢、その中間に中間嚢がある。層板の両端には、シス側にシスゴルジ網 (CGN)、トランス側に TGN がある。

ゴルジ体は、タンパク質の輸送、翻訳後修飾、分泌の調節など、細胞内で保存されている多くの重要な機能を担っている。ゴルジ体内腔の pH は NHE などのトランスポーターによって厳密に調節されている。したがって、NHE などのゴルジ体関連タンパク質の変異は、ゴルジ体の配向や形態を変化させ、前述した多くの機能に影響を与えることが報告されている [128]。

ゴルジ体によるタンパク質輸送機構は、膜小胞を介した細胞内小器官の間を輸送する、メンブレントラフィックと呼ばれる。メンブレントラフィックは、積荷タンパク質を乗せた膜小胞が、供与する側の細胞内小器官の膜からの出芽、細胞

内の移動、標的の細胞内小器官への結合と融合といった一連の流れによって、積荷を選別してそれぞれの目的地に正確に輸送する機構である (Fig. 1-11) [129]。細胞内の全タンパク質のうち約3分の1は粗面小胞体で合成され、膜小胞に包まれた積荷タンパク質がゴルジ体へと輸送される。このメンブレントラフィックによる積荷タンパク質のエキソサイトーシスには、各細胞小器官の固有の pH が重要である。[130, 131, 132] このメンブレントラフィックが破綻した場合、積荷となるタンパク質が目的地に輸送されず、細胞の生命活動が維持できなくなり、種々の疾病の原因となる。

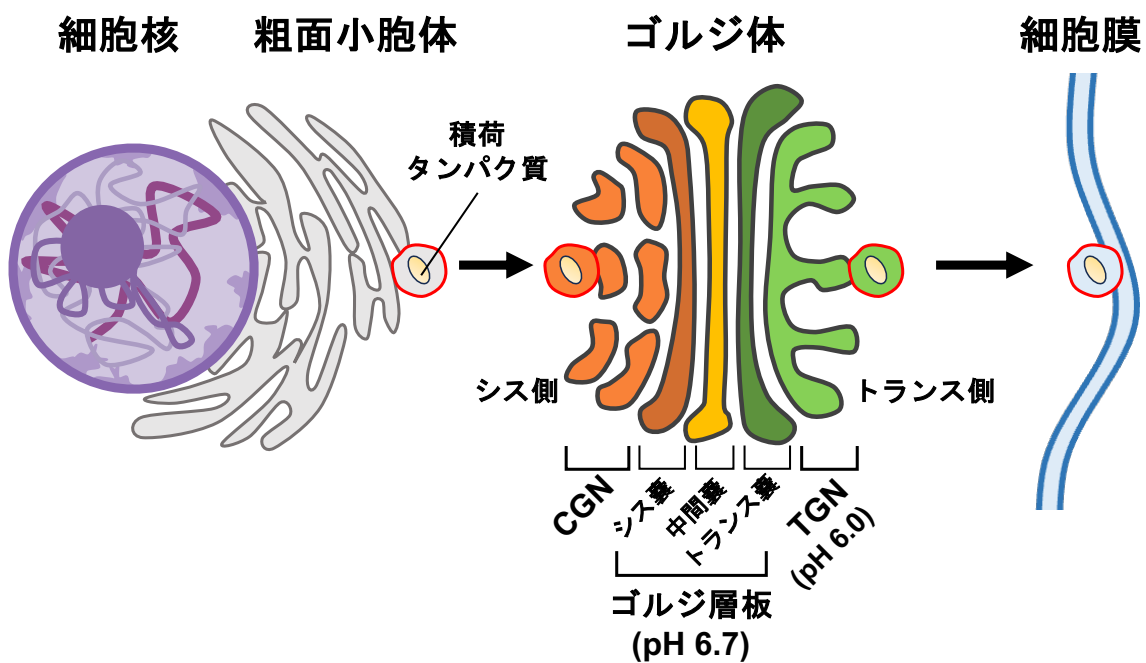


Fig. 1-12. ゴルジ体の構造と極性

第2項 トランスゴルジ網 (TGN)

TGN から細胞膜やエンドソーム、リソソームなどの細胞内小器官に向かう積荷タンパク質は、正しく輸送されるために、細胞質ドメインに含まれるさまざまな種類の選別シグナルに認識され、対応する輸送小胞に選別される (Fig. 1-13) [133]。積荷タンパク質のメンブレントラフィッキングに中心的な役割を果たす分子として、クラスリン及びAPがある。APには数種類あり、AP-1 及び AP-2 はクラスリン依存的に膜輸送が行われる。これに対し、AP-3 及び AP-4 はクラスリン非依存的に膜輸送が行われる。AP-2 は第1章第2節第3項で前述したように細胞外から物質を取り込むクラスリン依存性エンドサイトーシスに関与する AP である。クラスリン/AP-1 又は AP-4 単独でコーティングされた小胞は、TGN 上の小胞形成に関与しており、TGN と初期エンドソームとの輸送を媒介することが報告されている。AP-3 は、TGN からリソソームへのいくつかのリソソームタンパク質の直接輸送を媒介することが示唆されている。

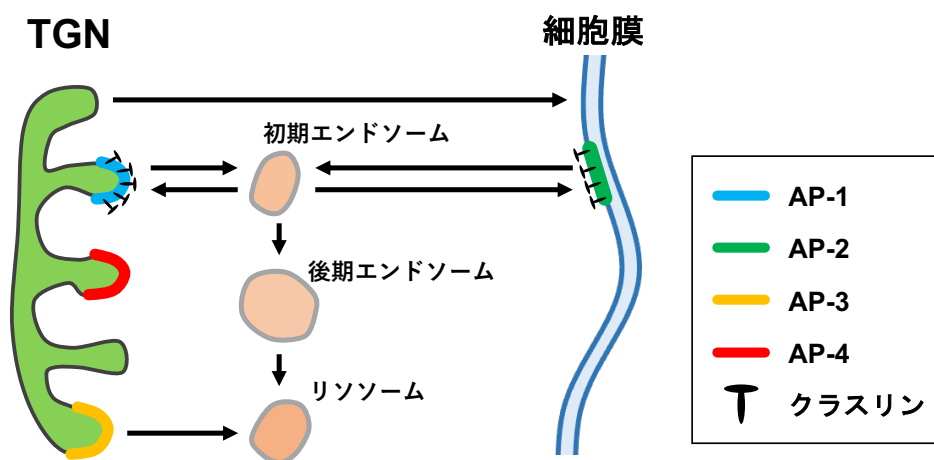


Fig. 1-13. クラスリン及び AP の細胞内局在と積荷タンパク質の極性

第 8 節 本研究の目的と意義

本研究では、がん細胞に対して高い抗腫瘍活性を有する hLF-HSA の抗腫瘍メカニズムを明らかにすることを目的とした。その戦略として、hLF の細胞内取り込みに着目し、取り込みと活性発現との相関関係及び、抗腫瘍メカニズムを明らかにする。本研究では、hLF-HSA の高い増殖阻害活性が報告されているヒト肺がん細胞を用いた。さらに、抗腫瘍メカニズム解析として、細胞内に送達された hLF が細胞内 pH にどのように影響するのか検証する。

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、ヒト肺腺がん細胞株 PC-14 に対する hLF-HSA の細胞内取り込み及び増殖阻害活性を検証する。この解析により、hLF の細胞内取り込み及び抗腫瘍活性発現との関係を明らかにできる。そして、hLF の活性増強メカニズムを明らかにすることで、そのバイオ医薬品としての開発に貢献できる。

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、HSA 融合によって、細胞内に送達された hLF の抗腫瘍メカニズムをヒト肺腺がん細胞株 PC-9 を用いて明らかにする。そのために、近年注目されているがん細胞の増殖に密接に関わる NHE7 による細胞内小器官 pH 制御に着目し、hLF-HSA の細胞増殖阻害に、NHE7 が関与しているかどうか検証する。この解析により、不明な点の多い NHE7 のヒト肺がん細胞における生理的な機能の解明も期待される。

第 4 章「結論」では、本研究で得られた知見をまとめる。

本研究は、hLF の細胞内送達及び、NHE7 による pH 恒常性の機構についての基礎研究として極めて重要であり、意義深いものである。

第2章 アルブミン融合によるヒトラクtoferrinの細胞内 送達促進と抗腫瘍活性増強

第1節 緒言

hLFは、多機能性タンパク質であり、抗腫瘍や抗炎症、抗酸化など有用な活性を有しており創薬シーズとして期待される [1, 2, 7-9]。しかしながら、未だにバイオ医薬品として上市はなされていない。血中安定性の向上を目的に作製された hLF-HSAは、hLF単独と比較して、特にヒト肺線がん細胞に対して増強した増殖阻害活性を示した [3]。HSA融合は、主にHSAが活性化するカ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輸送する技術として確立している [4]。したがって、本章では、hLF-HSAのヒト肺腺がん細胞に対する増殖阻害メカニズムを明らかにすることを目的に、その細胞内取り込みに焦点を当てた。本研究ではヒト肺腺がん細胞株PC-14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する。

第2節 実験方法

第1項 細胞培養

ヒト低分化型肺腺がん細胞株PC-14 [免疫生物研究所]の培養には、10%ウシ胎児血清(FBS) [biosera]を含むRPMI-1640 [Wako]を使用した。細胞は、-80°Cの冷凍庫に凍結保存されており、保存されている細胞を37°C水浴インキュベーターで2分間培養した。37°Cに加温した培養液を分注した遠沈管に保存液全量を移し、200 × g、4°C、2分遠心分離した。上清をアスピレーターにて取り除き、ペレットを適量の培養液で懸濁した。細胞懸濁液を10 cmシャーレに播種し、37°C 5% CO₂インキ

ュベーター内で4日程度培養した。80%程度の密度に達した後、上清をアスピレーターにて用いて取り除き、トリプシン/EDTA [Wako]を添加し、37°C 5% CO₂インキュベーター内で4分間反応させた。顕微鏡でシャーレから細胞が剥がれたことを確認した後、培地を加え、200 × g、4°C、2分遠心分離した。上清を取り除き、培地で懸濁後、至適細胞濃度を計算し細胞実験に使用した。

第2項 タンパク質の調製

2-1. 鉄飽和型 (Holo) hLF

クロコウジカビ (*Aspergillus niger*)で生産された組換え hLF [NRL Pharma]を、3 mMのエチレンジアミン四酢酸を含む0.1 Mクエン酸溶液 (pH 2.1)に溶解した。室温で24時間振とう反応した。反応後、溶液を透析膜に移し、2 Lの蒸留水で24時間透析し、鉄イオンを除去した (Apo hLF)。透析膜に入った Apo hLF を、0.001%クエン酸第二鉄アンモニウムと50 mM炭酸水素塩を含む50 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.5)で24時間透析した。次に1 LのPBSで1時間の透析を2回行った。その後、2 LのPBSに一晩透析した。回収後、滅菌用マイレクスシリンジフィルター (孔径0.22 μm) [Millipore]とシリンジ [TERMO]を用いて滅菌した。タンパク質濃度はBradford Protein Assay [Bio-Rad]で算出した。hLF中の鉄含有量は、Fe-Cテストキット[Wako]を用いて測定した。濃度測定後、Holo hLF を-80°Cの冷凍庫で凍結保存した。本研究では、CHO DG44/hLF-HSA細胞で生産されたhLF-HSA (1302 ng Fe³⁺/mg hLF相当)はHolo型であることから、Holo hLF (1588 ng Fe³⁺/mgタンパク質、以下hLFと示す)を用いた。

2-2. HSA

HSA [Wako]を PBS に溶解した。溶解後、滅菌用マイレクスシリンジフィルターとシリンジを用いて滅菌した。タンパク質濃度は Bradford Protein Assay で算出した。濃度測定後、HSA を-80°Cの冷凍庫で凍結保存した。

2-3. Holo hLF-HSA

Holo hLF-HSA (1302 ng Fe³⁺/mg hLF 相当、以下 hLF-HSA と示す)の安定発現株である CHO DG44/hLF-HSA 細胞の培養には、10% FBS を含む RPMI-1640 を使用した。CHO DG44/hLF-HSA 細胞を T-175 フラスコ [greiner]に適切な細胞数で播種し、70~80%程の密度まで培養した。上清をアスピレーターで取り除き、PBS 15 ml で細胞を洗浄した。PBS をアスピレーターで除去し、Hybridoma Serum Free Medium (SFM) [Gibco] 30 ml を添加した。4 日間培養し、培養上清を回収した。回収した培養上清は、陽イオン交換担体である Macro Cap SP [GE healthcare]を用いて精製した。ポリプレップカラム [Bio-Rad]に充填した Macro Cap SP を 10 mM のリン酸ナトリウムバッファーで平衡化した。回収した培養上清の全量がカラム内を 3 回通過するまで 10°Cで循環反応させた。反応後、10 mM リン酸ナトリウムバッファーの塩濃度を段階的に上昇させ、担体に非特異的に結合した分子などを洗浄した。最終的に 1.0 M NaCl を含む 10 mM リン酸ナトリウムバッファーで hLF-HSA を溶出し、固定波長 UV 検出器 [EYELA]に検出された画分を溶出画分として回収した。回収した溶出画分は、透析膜に移し、1 L の PBS で 1 時間の透析を 2 回行った。その後、2 L の PBS に一晚透析した。透析後、hLF-HSA を高濃度での実験にも使用できるように、限外濾過ユニット [Sartorius]を用いて濃縮した。限外濾過ユニットの膜には長期保存用にグリセロールとアザイドが含まれている。そのた

め、使用前の洗浄操作として、限外濾過ユニット上部に PBS を加え、2500 × g、4°C で遠心した。ユニット上部及び下部の PBS を取り除いた。精製した hLF-HSA を注ぎ、2500 × g、4°C で遠心した。任意の濃度 (8.0 mg/ml 以上) になるように濃縮した。タンパク質濃度は Bradford Protein Assay で算出した。濃縮後、hLF-HSA を回収し、滅菌用マイレクスシリンジフィルターとシリンジを用いて滅菌した。滅菌後、最終的な濃度を測定し、hLF-HSA を -80°C の冷凍庫で凍結保存した。

2-4. Alexa Fluor 488-標識タンパク質

hLF 及び hLF-HSA を PBS で希釈し、2 mg/ml の希釈溶液それぞれ 1 ml ずつ調製した。調製した溶液に 1 M の NaHCO₃ 溶液を 100 µl 添加した。各タンパク質と Alexa Fluor 488 5-TFP [Invitrogen] のモル比が 1:10 になるようにジメチルスルホキシド (DMSO) [Wako] で溶解した 10 mg/ml の Alexa Fluor 488 5-TFP を添加し、遮光して 1 時間振とう反応した。反応後の溶液を透析膜に移し、1 L の PBS で 1 時間の透析を 2 回行った。その後、2 L の PBS で一晩透析し、最後に 3 L の PBS で 3 時間透析した。分光光度計で 280 と 494 nm で吸光度を測定し、各タンパク質の濃度を算出した。計算式を以下に示した。濃度測定後、Alexa Fluor 488-標識タンパク質を -80°C の冷凍庫で凍結保存した。

$$\text{Protein concentration (M)} = \frac{[A_{280} - (A_{494} \times 0.11)] \times \text{dilution factor}}{\text{タンパク質のモル吸光係数}}$$

第 3 項 Alexa fluor488-標識タンパク質を用いた細胞内取り込み (Fig. 2-3, 2-5A, 2-8E)

最終濃度 0.1% となるように豚ゼラチン [IWAKIGLASS] を添加した PBS (0.1% 豚ゼラチン溶液) 100 µl/well で 1 時間コートした 96 ウェルイメージングガラス底マイ

クロプレート [Thermo Fisher Scientific]に、PC-14 細胞を 1.0×10^4 cells/well の密度で播種し、一晚培養した。試験培地 100 μ l/well を加え、1 時間培養した。これ以降の操作は遮光条件下で行った。洗浄操作を行い、細胞表面に結合したタンパク質を除去した。次にそれらを 4%パラホルムアルデヒド [Wako] 100 μ l/well で 10 分間固定した。細胞核染色のために DAPI [DOJINDO] 0.1 μ g/ml、細胞膜染色のために CF594 標識小麦胚芽凝集素 (WGA) [Biotium] 5 μ g/ml になるように PBS で希釈し染色液を調製した。WGA は、細胞膜マーカーであるシアル酸及び N-アセチルグルコサミンと特異的に結合するレクチンである。固定後、細胞を PBS 100 μ l/well で 2 回洗浄し、染色液 100 μ l/well で 10 分間染色した。細胞を PBS 100 μ l/well で 2 回洗浄し、細胞の蛍光像を共焦点レーザー走査型顕微鏡 [Olympus FV31S-SW]で検出した。検出されたデータを解析ソフト ImageJ で解析した。ImageJ の自由型ツールを用いて細胞内領域をマニュアルで囲い、輝度値を算出した (**Fig. 2-1**)。棒グラフは、細胞 1 つ当たりの輝度値の平均値 (n=50-100)を使用し、コントロールを 100% とした。各 Figure の追加条件を以下に示した。

Fig. 2-4 の場合、1.25 μ M Okadaic acid (セリン/スレオニンホスファターゼ [PP2A] 阻害剤、カベオラ依存性エンドサイトーシス活性剤) [Cayman CHEMICAL] を含む PBS で 30 分前処理してから、試験培地である 0.3 μ M Alexa fluor488-hLF 及び 1.25 μ M Okadaic acid を含む PBS で 1 時間処理した。Okadaic acid の溶媒にはエタノールを使用し、コントロールを含むすべてのサンプルは、最終的に 1% エタノールを含む条件で調製された。

Fig. 2-5A の場合、試験培地として 0.3 μ M Alexa fluor488-hLF-HSA 及び 10% FBS を含む PBS を使用した。

Fig. 2-8E の場合、試験培地には、0.3 μM Alexa fluor488-hLF-HSA と競合サンプルとして蛍光標識されていない 30 μM hLF 又は HSA を含む PBS を使用した。

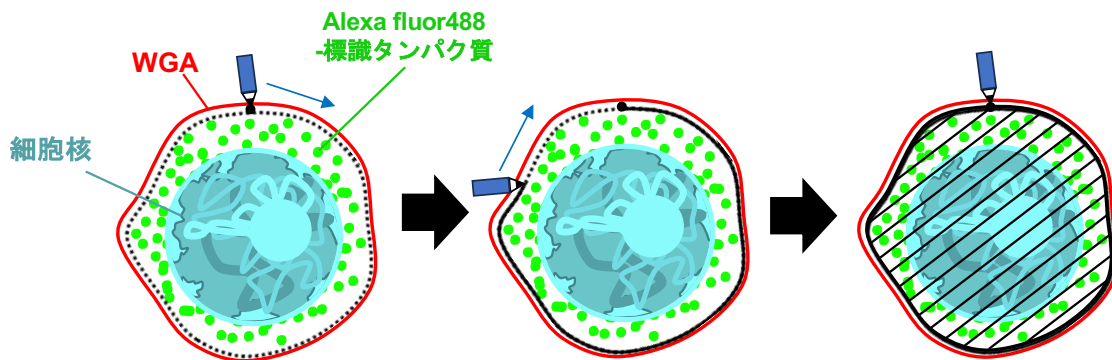


Fig. 2-1. 細胞内領域の解析方法とその定義

WGA を使用した場合、その内側を ImageJ の自由ツールを用いて囲い、黒い斜線部を細胞内領域と定義して解析した。

第 4 項 RNA 干渉 (Fig. 2-7E, F, G)

200 nM に RPMI-1640 で希釈した Stealth small interfering RNA (siRNA) oligo [Thermo Fisher Scientific] 又は Stealth RNAi negative control Medium GC duplex [Thermo Fisher Scientific] と 2% に RPMI-1640 で希釈した Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent [Invitrogen] をそれぞれ調製した。それぞれの溶液を等量混合し、タッピングしてから室温で 10 分間静置した。静置後、溶液を 1.7×10^5 cells/ml の細胞懸濁液で 10 倍に希釈した。これを 0.1% の豚ゼラチン溶液で 1 時間コートした培養プレートに播種した。細胞播種後、48 時間培養し、各実験に使用した。標的配列は以下の通りである。Cav-1: センス 5'-UUU CCC AAC AGC UUC AAA GAG UGG G-3'; アンチセンス 5'-CCC ACU CUU UGA AGC UGU UGG GAAA-3'。各 Figure での播種細胞数を以下に示した。

Fig. 2-7E の場合、24 ウェル培養プレート [VIOLAMO] に細胞を 1.2×10^6 cells / well の密度で播種した。**Fig. 2-7F** の場合、96 ウェルイメージングガラス底マイクロプレートに細胞を 1.0×10^4 cells / well の密度で播種した。**Fig. 2-7G** の場合、96 ウェル培養プレート [VIOLAMO] に細胞を 7.5×10^3 cells / well の密度で細胞を播種した。

第 5 項 免疫蛍光染色法による細胞内取り込み (**Fig. 2-4A, B, 2-7A, B, F, 2-8B, D, 2-9B**)

0.1% 豚ゼラチン溶液 100 μ l/well で 1 時間コートした 96 ウェルイメージングガラス底マイクロプレートに、細胞を 1.0×10^4 cells/well の密度で播種し、一晩培養した。この際培地は 10% FBS を含む添加 RPMI-1640 を使用した。試験培地 100 μ l/well で交換し、1 時間培養した。それらを PBS 100 μ l/well で 2 回洗浄した。次に、4% パラホルムアルデヒドを含む PBS 100 μ l/well で室温、10 分間固定し、PBS 100 μ l/well で 2 回洗浄し、0.05% Triton X-100 [Wako] を含む PBS 100 μ l/well で 10 分間透過処理した。ブロッキングワシ [Nacalai tesque] 100 μ l/well で 30 分間ブロッキング処理した。PBS で希釈した 1 次抗体 100 μ l/well で 1 時間反応した。PBS 100 μ l/well で 2 回洗浄し、PBS で希釈した 2 次抗体 100 μ l/well で室温で 1 時間反応した。Hoechst 33258 [SIGMA] を 2 μ g/ml 100 μ l/well で加え細胞核を 10 分間染色した。PBS 100 μ l/well で 2 回洗浄し、細胞の明視野像と蛍光像を共焦点レーザー走査型顕微鏡で検出した。検出されたデータを解析ソフト ImageJ で解析した。ImageJ の自由型ツールを用いて細胞内領域をマニュアルで囲い、輝度値を算出した(**Fig. 2-2**)。棒グラフは、細胞 1 つ当たりの輝度値の平均値 (n=50) を使用し、コントロールを 100% とした。各 Figure の追加条件を以下に示した。使用した抗体に関しては **Table. 2-1** に示した。

Fig. 2-4A の場合、0.38 μM の hLF、HSA、hLF+HSA (同時添加)又は hLF-HSA を含む RPMI-1640+10% FBS を使用した。

Fig. 2-4B の場合、FBS 中の BSA を懸念して、血清を含まない RPMI-1640 を使用した。

Fig. 2-7A, B の場合、細胞を 5 mM M β CD (コレステロール枯渇剤、カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤) [Wako]又は 5 μM Genistin (チロシンキナーゼ阻害剤、カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤) [TOKYO CHEMICAL INDUSTRY] を含む RPMI-1640+10% FBS 100 μl /well で 30 分前培養した。前処理後、試験培地として各阻害剤及び 0.38 μM hLF-HSA を含む RPMI-1640+10% FBS を使用した。Genistin の溶媒には DMSO を使用し、コントロールを含むすべてのサンプルは、最終的に 1% DMSO を含む条件で調製された。

Fig. 2-7F の場合、96 ウェルイメーキングガラス底マイクロプレート上で 48 時間培養された Cav-1 ノックダウン細胞に試験培地を添加した。試験培地として 0.38 μM hLF-HSA を含む RPMI-1640+10% FBS を使用した。

Fig. 2-8B の場合、0.38 μM hLF 又は hLF-HSA と 0.38 μM HS [PG Research] 又は HP[PG Research]を含む RPMI-1640+10% FBS を調製し、37°Cに設定したアルミブロック [EYELA]で 30 分静置した。30 分後、試験培地として使用した。

Fig. 2-8D の場合、細胞播種時に 1 mM 塩素酸ナトリウム (NaClO_3) [Wako] を含む RPMI-1640+10% FBS 100 μl /well で 24 時間前培養した。培養後、試験培地として 1 mM NaClO_3 及び 0.38 μM hLF を含む RPMI-1640+10% FBS を使用した。

Fig. 2-9B の場合、細胞播種時に 50 mM NaClO_3 を含む RPMI-1640+10% FBS で 24 時間前培養した。培養後、試験培地として 50 mM NaClO_3 及び 50 μM HSA を含む

RPMI-1640 を使用した。HSA の細胞内取り込みを調べるため、FBS 中の BSA を懸念して、血清を含まない RPMI-1640 を使用した。

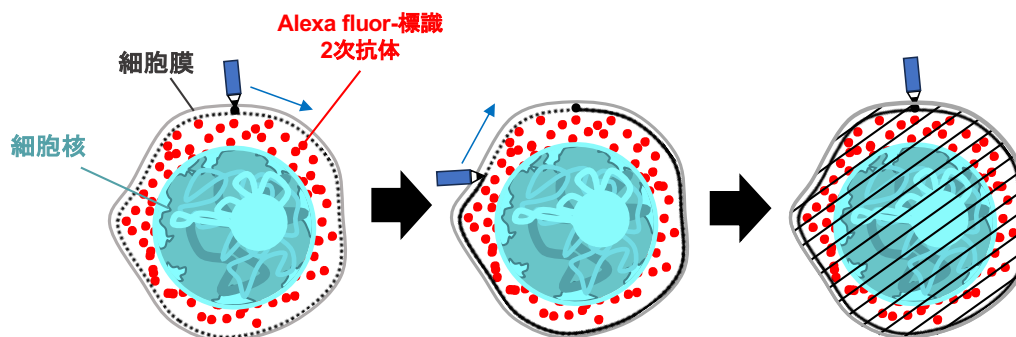


Fig. 2-2. 細胞内領域の解析方法とその定義

WGA を使用していない場合、明視野画像を用いて細胞膜を確認し、その内側を ImageJ の自由ツールを用いて囲い、黒い斜線部を細胞内領域と定義して解析した。

Table. 2-1. 免疫蛍光染色に使用した抗体一覧

抗体	メーカーとカタログ番号	希釈倍率
anti-hLF rabbit antibody	BETHYL, A80-144A	1:500
anti-HSA rabbit antibody	BETHYL, A80-129A	1:250
anti-rabbit IgG (H+L) Alexa fluor 546 conjugated antibody	Invitrogen, A11010	1:200
anti-goat IgG (H+L) Alexa fluor 568 conjugated antibody	abcam, ab175733	1:250

第 6 項 細胞増殖試験 (Fig. 2-4C, 2-5B, 2-7C, D, G, 2-8C, F)

0.1% 豚ゼラチン溶液 100 μ l/well で 1 時間コートした 96 ウェル培養プレートに PC-14 細胞を 5×10^3 cells/well の密度で播種し、一晩培養した。試験培地 100 μ l/well で 72 時間培養した。培養後、Cell Counting Kit-8 [DOJINDO] を 10 μ l 各ウェルに加え、1 時間培養した。1 時間後、マイクロプレートリーダー [Bio Rad] で 450 nm の波長で吸光度を読み取った。各 Figure の追加条件を以下に示した。

Fig. 2-4C の場合、試験培地として 10 μ M hLF、HSA、hLF+HSA 又は hLF-HSA を含む RPMI-1640+10% FBS を使用した。

Fig. 2-5B の場合、試験培地として 5 μ M hLF-HSA を使用した。サンプルの希釈は 10% FBS を無添加又は添加した SFM を用いた。SFM を用いた理由としては、血清を含まない RPMI-1640 の場合、細胞の増殖が悪く Cell Counting Kit-8 での発色がコントロールで低いため、血清を含まない条件で細胞を長期間培養可能な SFM を使用した。

Fig. 2-7C, D の場合、細胞播種時に 5 mM M β CD 又は 5 μ M Genistin を含む RPMI-1640+10% FBS 100 μ l/well で 24 時間培養した。培養後、各阻害剤及び 5 μ M hLF-HSA を含む RPMI-1640+10% FBS で培養した。Genistin の溶媒には DMSO を使用し、コントロールを含むすべてのサンプルは、最終的に 1% DMSO を含む条件で調製された。

Fig. 2-7G の場合、96 ウェル培養プレート上で 48 時間培養された Cav-1 ノックダウン細胞を 5 μ M hLF-HSA を含む RPMI-1640+10% FBS で 48 時間培養した。

Fig. 2-8C の場合、5 μ M hLF-HSA と 3.4 μ M HP を含む RPMI-1640+10% FBS を調製し、37°C に設定したアルミブロックで 30 分静置した。30 分後、試験培地として使用した。

Fig. 2-8F の場合、5 μ M hLF-HSA と競合サンプルとして 30 μ M hLF、HSA 又は hTF [SIGMA] を含む Hybridoma SFM を用いた。

第7項 ウエスタンブロッティング (Fig. 2-6A, 2-7E, 2-9A)

0.1% 豚ゼラチン溶液 300 $\mu\text{l}/\text{well}$ で 1 時間コートした 24 ウェル培養プレートに PC-14 細胞を 1.2×10^6 cells/well の密度で播種し、一晚培養した。培養された細胞の上清を除去し、冷却 PBS 300 $\mu\text{l}/\text{well}$ で 2 回洗浄した。1% Triton X-100 と cComplete™ プロテアーゼ阻害剤カクテル [Roche]、ホスファターゼ阻害剤カクテル溶液 II [Wako] 含む PBS 20 $\mu\text{l}/\text{well}$ で加え、4°C 条件で 1 時間振とう反応させた。反応後、細胞が懸濁した懸濁液を回収し 4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清 (細胞溶解液) を回収し、タンパク質濃度を Bradford Protein Assay [Bio-Rad] によって算出した。タンパク質濃度より算出された 30 μg 分の細胞溶解液を分注し、還元剤入りサンプルバッファーと混合した。サンプルと分子量マーカー (DynaMarker Protein MultiColor III Ladder Marker) [BioDynamics Laboratory] をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した。Fig. 2-6A, 2-7E の場合は 15% アクリルアミド分離ゲルを使用し、Fig. 2-9A の場合は 10% アクリルアミド分離ゲルを使用した。ニトロセルロースメンブレン [GE Healthcare] を超純水に浸した。泳動ゲル、ろ紙 6 枚、ニトロセルロースメンブレンを 10% エタノールを含むトリス-グリシンバッファー (ブロッティングバッファー) に浸し、それぞれ 15 分間、10 分間、3 分間振とう反応させた。セミドライトランスファー装置 [] にろ紙 3 枚、泳動ゲル、メンブレン、ろ紙 3 枚の順に重ね、150 mA、90 分間転写を行った。その後、トリス緩衝生理食塩水 (TBS) に最終濃度 0.05% となるように Tween 20 [Wako] を添加した溶液 (TBS-T) でメンブレンを 3 分間振とうした。この洗浄操作を 3 回行った。洗浄後、メンブレンを BSA [Wako] 又は北海道スキムミルク [雪印メグミルク] を含む TBS-T (ブロッキングバッファー) で室温、30 分ブロッキングした。ブロッキ

ングバッファーで希釈された一次抗体に交換し 4°Cで 16 時間振とう反応した。反応後、適量の TBS-T でメンブレンを 3 分間振とうした。この洗浄操作を 3 回行った。メンブレンをブロッキングバッファーで希釈された二次抗体と 4°Cで 1 時間振とう反応した。反応後、洗浄操作を 3 回行った。メンブレンに結合した抗体は、イムノスター LD [Wako]又はイムノスター®ゼータ [Wako]を使用して検出された。イムノブロット画像は ATTO CS Analyzer 3 [ATTO]を用いて撮影した。バンドの輝度値は ImageJ で定量化した。各 Figure の追加条件を以下に示した。使用した抗体やブロッキングバッファー、発光試薬等に関しては **Table. 2-2** に示した。

Fig. 2-4A の場合、細胞を 5 μ M hLF、HSA、hLF+HSA 又は hLF-HSA を含む RPMI-1640 で 5 又は 10 分処理した細胞を使用した。

Fig. 2-5E の場合、96 ウェル培養プレート上で 48 時間培養された Cav-1 ノックダウン細胞を使用した。

Fig. 2-7A の場合、細胞を 5 μ M HSA を含む RPMI-1640 で 1 時間処理した細胞を使用した。

Table. 2-2. ウエスタンブロッティングに使用した抗体一覧

抗体	メーカーとカタログ番号	希釈倍率	ブロッキングバッファー	発光試薬
anti-P-Cav-1 mouse antibody	BD Transduction Laboratories, AB_398863	1:1,000	1% BSA in TBST	Immunostar LD
anti-Cav-1 rabbit antibody	Cell Signaling, #3238	1:1,000	1% BSA in TBST	Immunostar Zeta
anti-γ1 Actin mouse antibody	Wako, 15903-1-AP	1:5,000	2% Skim milk in TBST	Immunostar Zeta
anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody	Promega, 65-6120	1:10,000	2% Skim milk in TBST	—
anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody	Promega, W4021	1:10,000	2% Skim milk in TBST	—

第 8 項 結合試験 (Fig. 2-8A)

96 ウェル ELISA プレート [Thermo Fisher Scientific] にヘパラン硫酸含有硫酸アンモニウム 90%飽和水溶液 100 $\mu\text{l/well}$ (2 $\mu\text{g/ml}$) で加え、4°C で 16 時間固相化した。固相化液を除去し、PBS に最終濃度 0.05% となるように Tween 20 [Wako] を添加した溶液 (PBS-T) 300 $\mu\text{l/well}$ で 3 回洗浄した。ブロッキング操作として、1% カゼインを含む TBS-T (ブロッキングバッファー) 300 $\mu\text{l/well}$ を処理し、500 rpm で室温、1 時間振とうさせた。各サンプルを希釈したブロッキングバッファー 100 $\mu\text{l/well}$ に交換し、室温で 4 時間振とう反応させた。サンプルには 0.1 μM hLF、競合剤には 1 μM 又は 10 μM の HS、HP、HSA 又は hTF を使用した。反応後、サンプルを除去し、PBS-T 300 $\mu\text{l/well}$ で 4 回洗浄した (洗浄操作)。ブロッキングバッファーで 10,000 倍に希釈された HRP 標識 Goat 抗 hLF 抗体 [A80-143P, BETHYL] 100 $\mu\text{l/well}$ で加え、室温で 1 時間振とう反応させた。抗体溶液を除去し、洗浄操作を行った。TMB 発色試薬 [Nacalai tesque] 100 $\mu\text{l/well}$ で加え、遮光条件で 15 分間静置した。1 N 硫酸 100 $\mu\text{l/well}$ で発色反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで 450 nm の波長で吸光度を読み取った。

第 9 項 統計解析

データはすべて平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。統計的に有意な差は、対になっていない Student-t 検定 (Fig. 2-3B, 2-5A, 2-7A, B, 2-9B)、Dunnett 検定 (Fig. 2-4A, B, 2-4C, 2-7E, 2-8A, 2-8E, 2-9A)、Tukey の検定 (Fig. 2-6B) を用いた。更に、薬剤 2 剤の交互効果を考慮するために、二元配置分散分析して交互作用が認められた場合は Tukey 検定 (Fig. 2-7C)、認められなかった場合は対になっていない Student-t 検定

(Fig. 2-7D, 2-7G, 2-8C)を用いて決定した。すべての統計解析は EZR ソフトウェア (<https://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmedEN.html>)を用いて行った。 p 値 <0.05 は統計的に有意な差とみなした。

第3節 結果・考察

第1項 ヒト肺線がん細胞株 PC-14 における hLF の細胞内取り込みに対するカベオラ依存性エンドサイトーシス活性剤の影響

ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 への hLF の取り込みは、コレステロール依存性であることが報告されている [63]。したがって、コレステロールに関連するカベオラ依存性エンドサイトーシスの活性化は、hLF-HSA の細胞内取り込みを促進する可能性は高い。hLF がカベオラ依存性エンドサイトーシスにより野生型 Ras 遺伝子のヒト肺腺がん細胞株 PC-14 [134]に取り込まれるか検討した。本研究では、よく知られたカベオラ依存性エンドサイトーシス活性化物質である Okadaic acid を用いた [135]。0.3 μ M の蛍光標識 hLF を 1 時間 PC-14 細胞に処理した結果、蛍光標識 hLF は細胞膜の分子マーカーである WGA と共局在した (Fig. 2-3A)。この hLF の特徴的な細胞表面への局在は、細胞表面に発現する硫酸化グリコサミノグリカン (GAGs) と hLF が相互作用した可能性が考えられる。その一方で、Okadaic acid を用いると、蛍光標識 hLF の細胞内への局在が観察され (Fig. 2-3A)、その取り込みを半定量した結果、Okadaic acid 未処理と比較して約 3.5 倍と統計的に有意に増加した (Fig. 2-3B)。すなわち、カベオラ依存性のシグナル伝達が亢進すれば、hLF の細胞内取り込みが促進されることが示された。

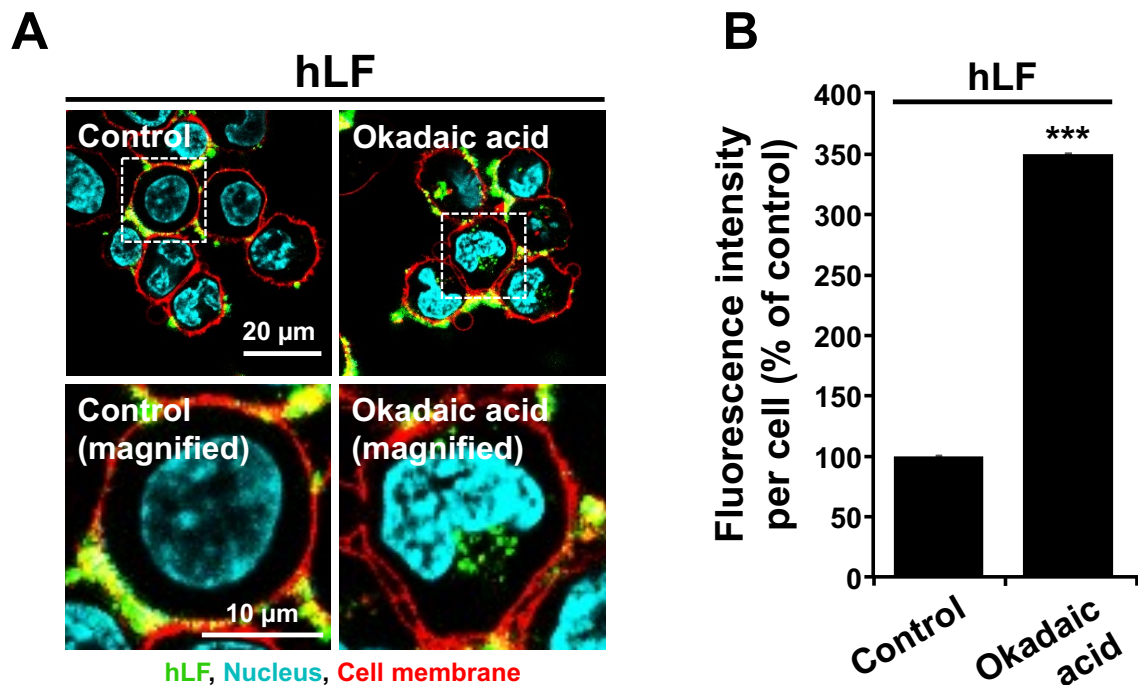


Fig. 2-3. ヒト肺線がん細胞株 PC-14 における hLF の細胞内取り込みに対するカベオラ依存性エンドサイトーシス活性剤の影響

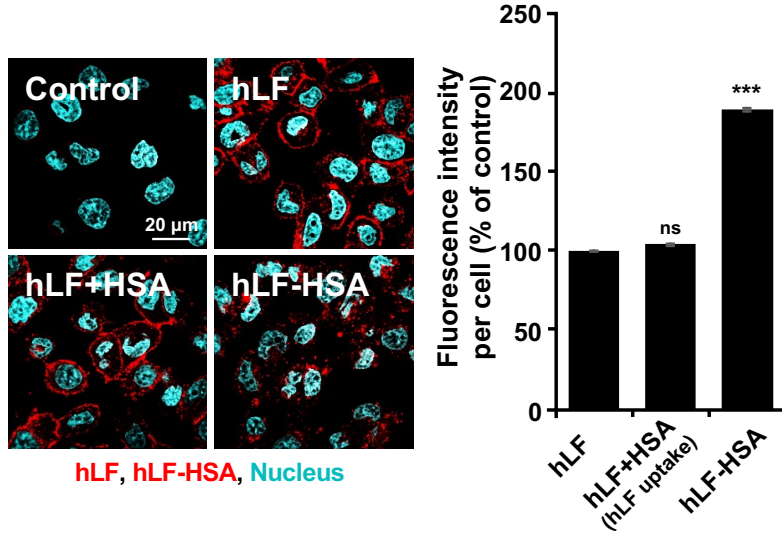
(A) は、カベオラ依存性エンドサイトーシス活性剤 (1.25 μ M Okadaic acid) 非存在下と存在下で 0.3 μ M 蛍光標識 hLF の細胞内取り込み画像を示す。蛍光標識 hLF は PC-14 細胞に 1 時間処理した。緑は蛍光標識 hLF、青は細胞核、赤は細胞膜を示す。(B) は、細胞内の蛍光強度を ImageJ で解析し、値は平均 \pm SD (n=100) で示した (***) $p < 0.001$ 。

第 2 項 hLF、HSA 又は hLF-HSA の細胞内取り込み及びそれらが細胞の増殖に及ぼす影響

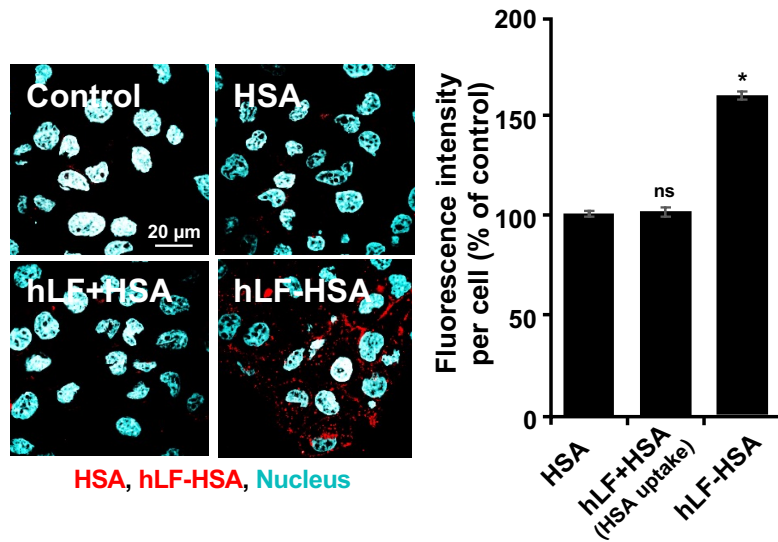
hLF の血中安定性の向上を目的に作製された、hLF-HSA は、PC-14 細胞に対して高い細胞増殖阻害活性を示した [3]。本研究では、hLF-HSA の増殖阻害メカニズムとして、HSA 融合による hLF の細胞内取り込み促進が原因であると考えた。HSA

の誘導するカベオラ依存性エンドサイトーシスの活性化を介して hLF が細胞内に取り込まれているのかを明らかにするために、それぞれの抗体をプローブとする hLF と HSA の免疫染色を用いて、蛍光標識していない各タンパク質 (0.38 μ M) の細胞内取り込みを調べた。各タンパク質を取り込ませる条件として、細胞増殖試験と条件を合わせるために、10% FBS 含有培地で行った。hLF に対する抗体を用いた免疫染色では、蛍光標識 hLF と同様に hLF 単独は主に細胞表面に結合した (**Fig. 2-4A**)。このことから、hLF の細胞表面への結合活性に対する蛍光標識による影響は低いと考えられる。hLF と HSA との同時添加では、それらの細胞内局在における影響は、hLF や HSA 単独と比較して観察されなかった (**Fig. 2-4A**)。HSA に対する抗体を用いた免疫染色では、HSA 単独の細胞内取り込みは観察されなかった (**Fig. 2-4B**)。また、hLF と HSA との同時添加 (hLF+HSA) による HSA の細胞内取り込みにおける影響もなかった。一方、hLF-HSA は FBS 含有培地中の PC-14 細胞に取り込まれた (**Fig. 2-4A, B**)。このことから、HSA 単独でのカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナル活性化は低く、hLF と HSA との融合による相乗効果はその活性化に重要である可能性を示している。次に、各タンパク質を 72 時間処理した PC-14 細胞に対する増殖阻害活性を評価した。10 μ M hLF 単独、HSA 単独、又は同濃度の hLF と HSA の同時添加では増殖阻害活性を示さなかった (**Fig. 2-4C**)。一方で、10 μ M hLF-HSA は増殖阻害活性を示した。これらの結果は、hLF-HSA の細胞内取り込みと増殖阻害活性との間に相関関係がある可能性を示している。

A



B



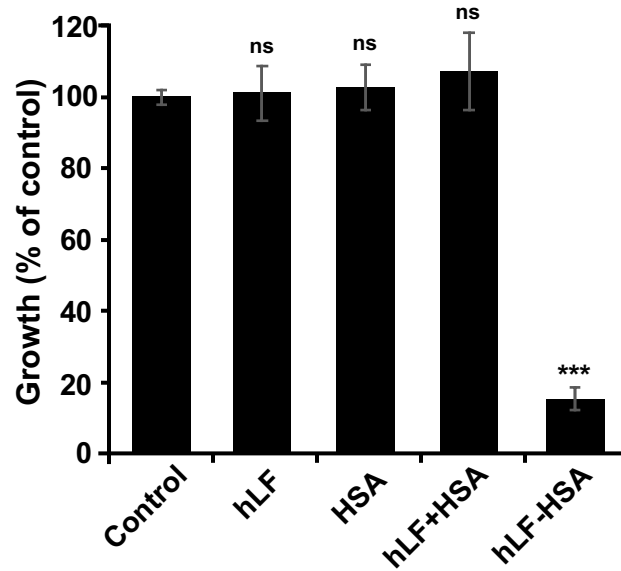
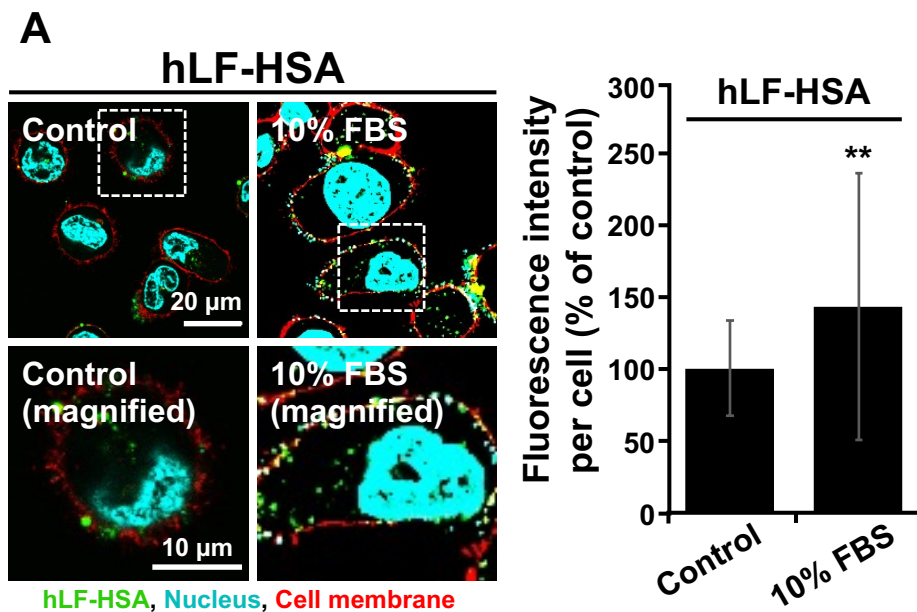
C

Fig. 2-4. hLF、HSA 又は hLF-HSA の細胞内取り込み及びそれらが細胞の増殖に及ぼす影響

(A, B) は、免疫染色法を用いた 0.38 μ M hLF、HSA、hLF と HSA の同時添加 (hLF+HSA) 又は hLF-HSA 細胞内取り込み画像を示す。各タンパク質は PC-14 細胞に 1 時間処理した。1 次抗体として (A) は抗 hLF 抗体、(B) は抗 HSA 抗体を使用した。赤は各タンパク質、青は細胞核を示す。細胞内取り込み画像の右には、細胞内の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均 \pm SD (n=50) で示した (ns, not significant; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)。 (C) は、10 μ M hLF、HSA、hLF+HSA 又は hLF-HSA を 72 時間処理した PC-14 細胞の細胞増殖試験の結果を示す。値は平均 \pm SD (n=3) で示した (ns, not significant; *** $p < 0.001$)。

第3項 hLF-HSA の細胞内取り込み及び増殖阻害活性に対する培地中に含まれるウシ胎児血清 (FBS) の影響

hLF-HSA は血清存在下 (10% FBS) で、細胞内取り込み及び増殖阻害活性を示した (Fig. 2-4)。10% FBS には、高濃度 (27 μ M) のウシ血清アルブミン (BSA) や糖鎖などが含まれているため、hLF-HSA の取り込み及び活性が 10% FBS 存在下で競合的に阻害されている可能性が懸念される。したがって、10% FBS 非存在下又は存在下における hLF-HSA の細胞内取り込み及び増殖阻害活性を調べた。無血清培地に 10% FBS を添加すると、0.3 μ M の蛍光標識 hLF-HSA の細胞内取り込みが 44% 有意に増加した (Fig. 2-5A)。PC-14 細胞に対する 5 μ M hLF-HSA の細胞増殖阻害活性は、11% 増加した (Fig. 2-5B)。FBS に含まれるコレステロールは、カベオラ依存性エンドサイトーシスを正に制御する因子の一つであり、hLF-HSA の取り込み促進につながる可能性が考えられる [136]。



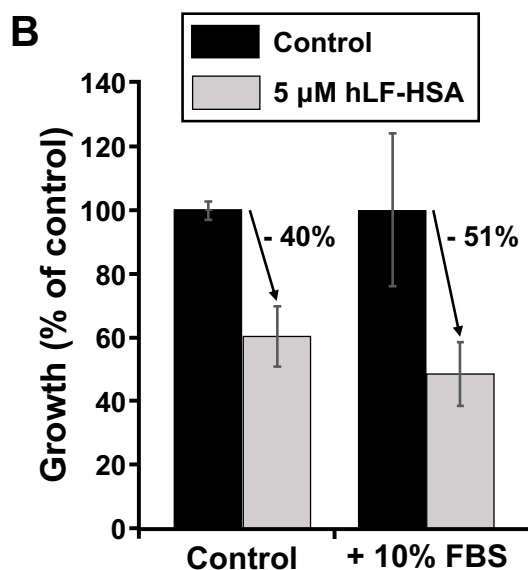


Fig. 2-5. hLF-HSA の細胞内取り込み及び増殖阻害活性に対する培地中に含まれる FBS の影響

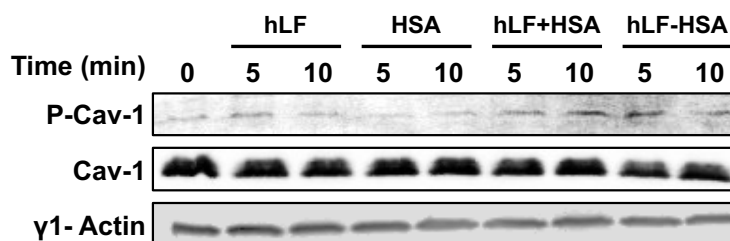
(A) は、FBS 非存在下と存在下の 0.3 μ M 蛍光標識 hLF-HSA の細胞内取り込み画像を示す。蛍光標識 hLF-HSA は PC-14 細胞に 1 時間処理した。緑は蛍光標識 hLF-HSA、青は細胞核、赤は細胞膜を示す。細胞内取り込み画像の右には、細胞内の蛍光強度を ImageJ で解析し、値は平均 \pm SD (n=50) で示した (** $p < 0.01$)。 (B) は、10 μ M hLF-HSA 及び 10% FBS を用いた細胞増殖試験の結果を示す。hLF-HSA は PC-14 細胞に 72 時間処理した。値は平均 \pm SD (n=3) で示した。

第 4 項 hLF-HSA 処理によるカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナルへの影響

カベオラ依存性エンドサイトーシスに直接関与する分子である Cav-1 のリン酸化は、エンドサイトーシス活性化に必須である [65]。カベオラ依存性エンドサイトーシスにおけるシグナル伝達を、リン酸化 Cav-1 (P-Cav-1) に対する抗体を用いて調べた。各サンプル (hLF、HSA、hLF と HSA の同時添加、hLF-HSA) 処理による、Cav-1 の発現量への影響は観察されなかった (Fig. 2-6A)。したがって、hLF-HSA が Cav-1 の発現量を上昇させることで、その細胞内取り込みを促進している訳ではな

いことが示された。hLF や HSA 処理による P-Cav-1 の発現量への影響はほとんど観察されなかった。hLF と HSA を同時添加 (hLF-HSA)した場合、相加効果として、シグナルの上昇が観察された。hLF-HSA は HSA と比較して相乗的なシグナルの上昇が観察された。次に、P-Cav-1 と Cav-1 の発現量の比を用いて、各サンプルによるカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナルの活性化を半定量した (Fig. 2-6B)。その結果、HSA 処理後の P-Cav-1 の発現量は、バックグラウンドおよび hLF 処理後と同等であった (Fig. 2-6B)。これは、HSA 単独で細胞内に取り込まれにくかった結果を支持するデータである (Fig. 2-4B)。hLF と HSA の同時添加においても HSA 単独と比較して影響は見られなかった。一方、hLF-HSA は HSA 単独と比較して相乗的にカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナルを有意に活性化した。この結果は、PC-14 細胞における hLF-HSA の細胞内取り込みとその増殖阻害活性と一致していた。

A



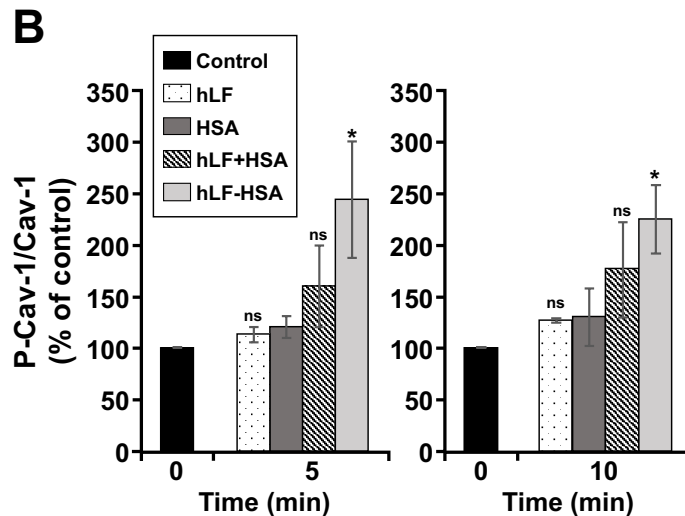


Fig. 2-6. hLF-HSA 処理によるカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナルへの影響

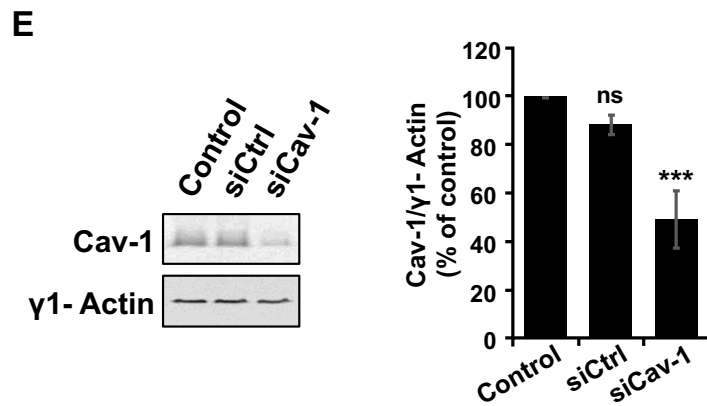
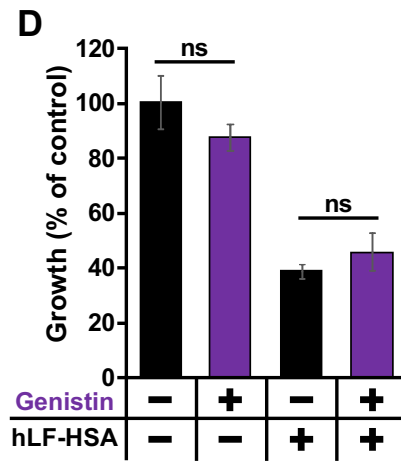
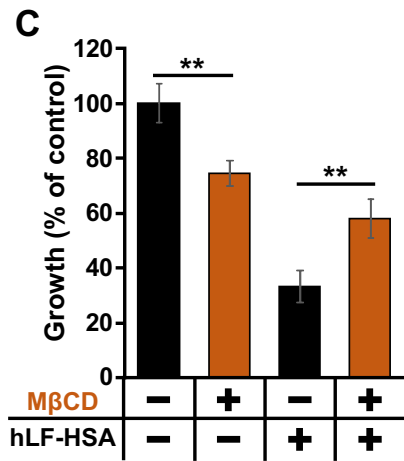
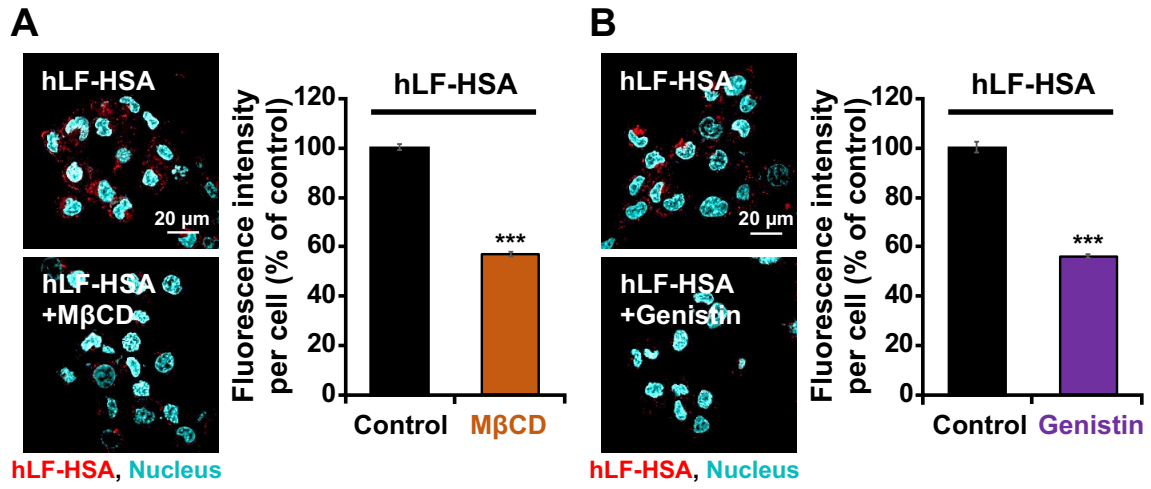
(A) は、濃度 5 μ M の各タンパク質を 5 分又は 10 分処理した PC-14 細胞の細胞溶解液の P-Cav-1、Cav-1、 γ 1-Actin に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。 γ 1-Actin は、ローディングコントロールとして使用した。(B) は、(A) で検出された P-Cav-1 と Cav-1 のバンドの蛍光強度の値を ImageJ で解析し、それらの値の比を用いて算出した。算出値は平均 \pm SD (n=3) で示した (ns, not significant; * p <0.05)。

第 5 項 hLF-HSA の細胞内取り込み及び増殖阻害活性に対するカベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害の影響

カベオラを介した hLF-HSA の細胞内取り込みの向上が、その増殖阻害活性の促進をもたらしたかどうかを調べるために、カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤又は Cav-1 を標的とする siRNA を用いて検証した。カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤である M β CD 及び Genistin 阻害剤でカベオラ依存性エンドサイトーシスを阻害すると、hLF-HSA の細胞内取り込みが有意に減弱した (Fig. 2-7A, B)。次に、各阻害剤処理に対する hLF-HSA の細胞増殖阻害活性への影響を評価した。

MβCD 処理によって、hLF-HSA の増殖阻害活性は統計的有意に減弱した (Fig. 2-7C)。Genistin 処理では、hLF-HSA の増殖阻害活性の減弱傾向が見られたものの統計的有意な差はなかった (Fig. 2-7C)。Cav-1 をノックダウンすると、そのタンパク質発現が 44%減少し (Fig. 2-7E)、hLF-HSA の細胞内取り込み (Fig. 2-7F) と増殖阻害活性 (Fig. 2-7G) の両方が減弱した。これらの結果から、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増殖阻害活性の減弱が確認されたことから、hLF-HSA は細胞内に取り込まれることで増殖阻害活性を示す可能性が示唆された。これらの結果は、がん細胞に対する hLF-HSA の増殖阻害活性が、細胞内取り込みの指標として使用できることを示している。

Cav-1 の高発現は、NSCLC、前立腺がん細胞、膵臓がん、及び乳がんを含む様々ながん細胞において報告されている。また、*in vivo* で Cav-1 の発現枯渇は、腫瘍の発生と増殖を抑制することが報告されている [137-141]。さらに Cav-1 の過剰発現によりがん細胞の転移性及び多剤耐性が向上することが示されている [142-144]。興味深いことに、NSCLC において、放射線及び白金製剤 (シスプラチン) などの化学療法処理によって Cav-1 の発現量が上昇し、化学療法に対する耐性が亢進することが報告されている [144, 145]。これらの報告から、hLF-HSA は他の化学療法との併用により、Cav-1 の高発現による薬剤耐性を獲得したがん細胞に対しても高い治療効果が期待できると予想される。



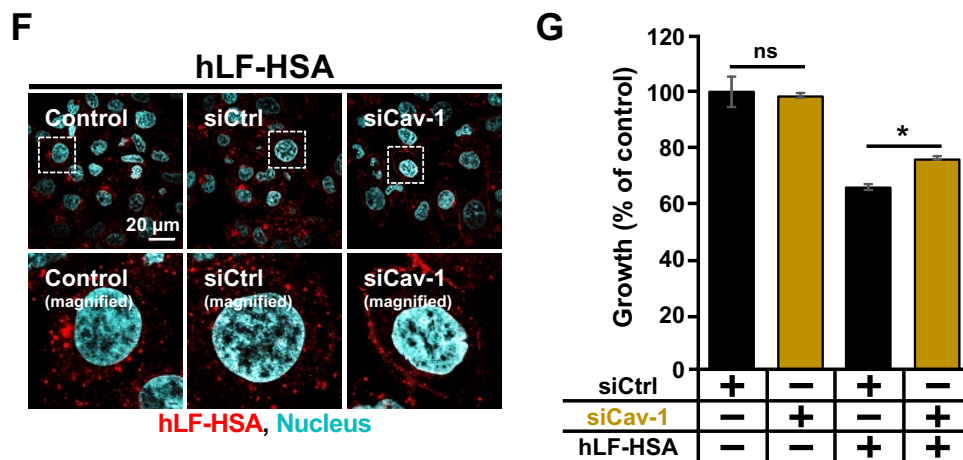


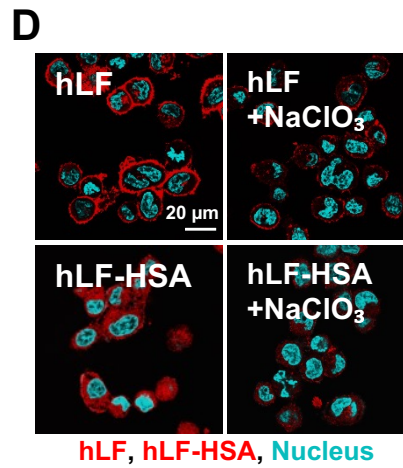
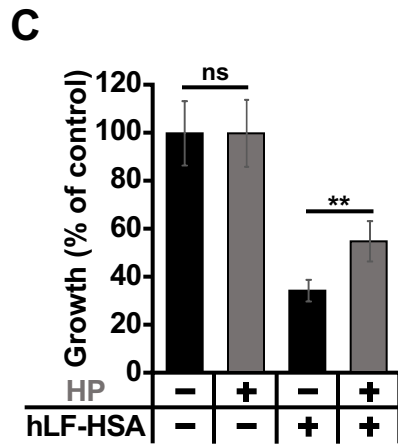
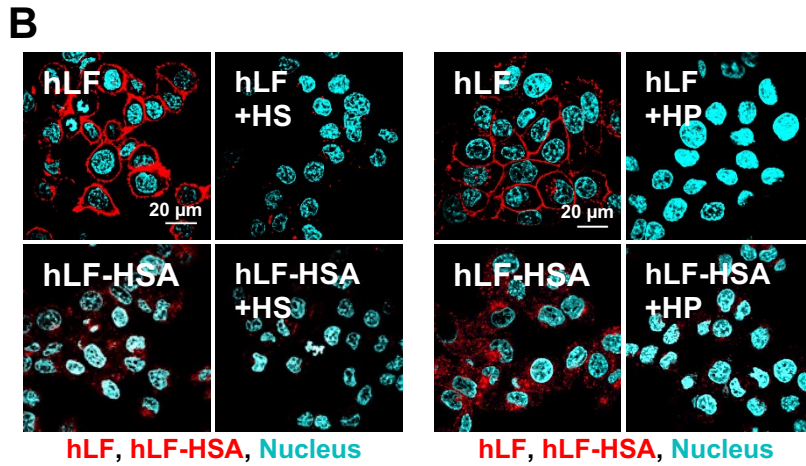
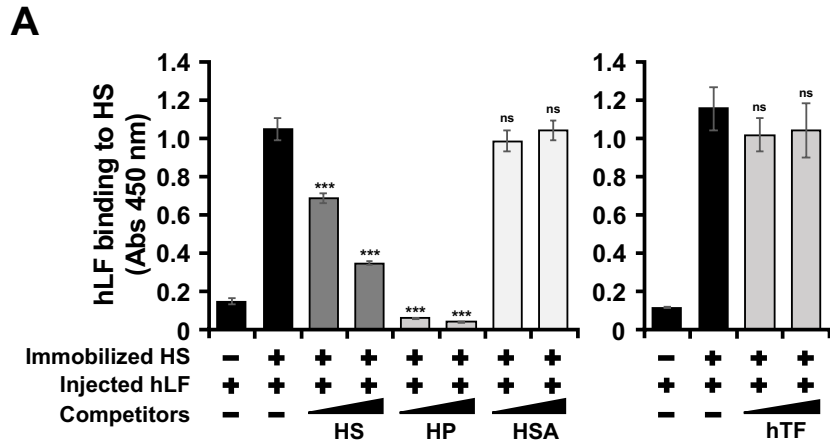
Fig. 2-7. hLF-HSA の細胞内取り込み及び増殖阻害活性に対するカベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害の影響

(A, B) は、免疫染色法を用いたカベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤 [5 mM M β CD (A)、5 μ M Genistin (B)]非存在下と存在下の 0.38 μ M hLF-HSA の細胞内取り込み画像を示す。hLF-HSA は PC-14 細胞に 1 時間処理した。1 次抗体として抗 hLF 抗体を使用した。赤は hLF-HSA、青は細胞核を示す。細胞内取り込み画像の右には、細胞内の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均 \pm SD (n=50)で示した (***p*<0.001)。 (C, D) は、5 mM M β CD (C)又は 5 μ M Genistin (D)非存在下と存在下の 5 μ M hLF-HSA の細胞増殖試験の結果を示す。hLF-HSA は PC-14 細胞に 72 時間処理した。値は平均 \pm SD (n=3)で示した (ns, not significant; ** *p*<0.01)。 (E) は、Cav-1、 γ 1- Actin に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。 γ 1- Actin は、ローディングコントロールとして使用した。右には、検出された Cav-1 と γ 1- Actin のバンドの蛍光強度の値を ImageJ で解析し、それらの値の比を用いて算出した。算出値は平均 \pm SD (n=3)で示した (ns, not significant; *** *p*<0.001)。 (F) は、Cav-1 ノックダウン細胞を用いた、免疫染色法による 0.38 μ M hLF-HSA の細胞内取り込み画像を示す。hLF-HSA は PC-14 細胞に 1 時間処理した。1 次抗体として抗 hLF 抗体を使用した。 (G) は、Cav-1 ノックダウン細胞を用いた、5 μ M hLF-HSA の細胞増殖試験の結果を示す。hLF-HSA は PC-14 細胞に 48 時間処理した。値は平均 \pm SD (n=3)で示した (ns, not significant; * *p*<0.05)。

第6項 hLF-HSAの細胞内取り込み及び増殖阻害活性に対する細胞表面上の硫酸化グリコサミノグリカン (GAGs)阻害の影響

hLF-HSA はカベオラ依存的なエンドサイトーシスを活性化し細胞内に取り込まれる。その後、細胞内に送達された hLF-HSA は、PC-14 細胞に対する増殖阻害活性をもたらすことが示された。しかし、hLF と HSA の同時添加では、HSA 単独によるカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナルの活性化効果が低く、上記の効果は得られなかった (**Fig. 2-4B, 2-6**)。hLF-HSA と HSA 単独の機能的な違いを理解するために、細胞表面に局在する hLF の性質 (**Fig. 2-3, 2-4 A**)に注目し、以下の仮説を立てた。hLF はがん細胞表面に発現する硫酸化糖鎖である GAGs の結合タンパク質であることから [146]、hLF-HSA は hLF の GAGs への結合を介して細胞表面にリクルートされる可能性があると考えた。これによって、hLF-HSA は細胞表面のアルブミン受容体 gp60 [147]に結合し、カベオラ依存性エンドサイトーシスを効率的に活性化できると考察した。一方、HSA 単独 (負電荷を持つ酸性タンパク質)では、主に負に帯電する GAGs からの静電的な反発のために、細胞表面に容易に近づくことができず、HSA は gp60 誘導性のカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナルをほとんど活性化できなかつたと考えた。この仮説を検証するため、固相結合アッセイを用いて hLF と GAGs との相互作用を確認した。以前に報告されたように [148]、hLF は ELISA プレート表面に固相化された細胞表面 GAGs の主成分である HS と結合した (**Fig. 2-8A 左**)。hLF の結合は過剰の HS 及び HP によって阻害されたが、HSA では阻害されなかつた (**Fig. 2-8A 左**)。hLF と構造的に類似している hTF [149]は結合を阻害しなかつたことから、その特異性が示された (**Fig. 2-8A 右**)。hLF と固相化された HS との結合に対して、HP は HS と比較して高い競合阻害効果が確

認された。HP は HS よりも硫酸基が多く、硫酸化の度合いが高いという特徴がある。硫酸化の度合いが高いことで hLF は HP に静電的に集積しやすくなり、高い競合阻害効果が確認されたと考察した。HS 又は HP への hLF の特異的結合に基づいて、hLF-HSA の細胞内取り込みにおけるこの相互作用の重要性を決定するために、以下の 3 つの方法を用いて hLF と細胞表面 GAGs との結合阻害を試みた。まず、hLF と細胞表面 GAGs との結合に対する競合物質として、HS 又は HP を用いた。0.38 μ M HS 又は HP の添加は、同濃度の hLF の細胞表面への集積と hLF-HSA の細胞内取り込みを阻害した (**Fig. 2-8B**)。また、HP の添加により hLF-HSA の増殖阻害活性が減弱した (**Fig. 2-8C**)。次に、細胞表面に発現するプロテオグリカンの硫酸化反応阻害剤 [24]である NaClO₃を用いて、hLF 及び hLF-HSA の細胞内取り込みへの影響を調べた。NaClO₃で処理した細胞では、hLF の細胞表面への蓄積と hLF-HSA の細胞内への取り込みが抑制された (**Fig. 2-8D**)。最後に、hLF-HSA と細胞表面 GAGs との結合を阻害するために、過剰な hLF を添加した。過剰な hLF の添加は、蛍光標識 hLF-HSA の細胞内への取り込みを阻害したが、過剰な HSA の添加は阻害効果を示さなかった (**Fig. 2-8E**)。また、過剰な hLF の添加は、hLF-HSA の PC-14 細胞に対する増殖阻害活性を減弱させた (**Fig. 2-8F 左**)。hLF のこの減弱効果は、hLF と類似した構造を持つ hTF 添加では観察されなかったことから、その特異性が示された (**Fig. 2-8F 右**)。以上より、hLF と細胞表面 GAGs との結合を阻害することで、hLF-HSA の細胞内への取り込み及び PC-14 細胞に対する増殖阻害活性が阻害された。したがって、hLF-HSA の細胞内取り込みとその抗腫瘍活性発現には、hLF と細胞表面 GAGs との結合が必須であることが示された。



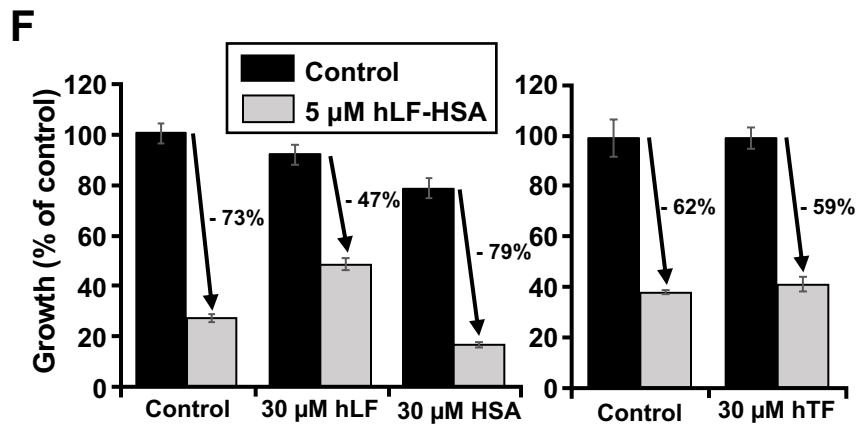
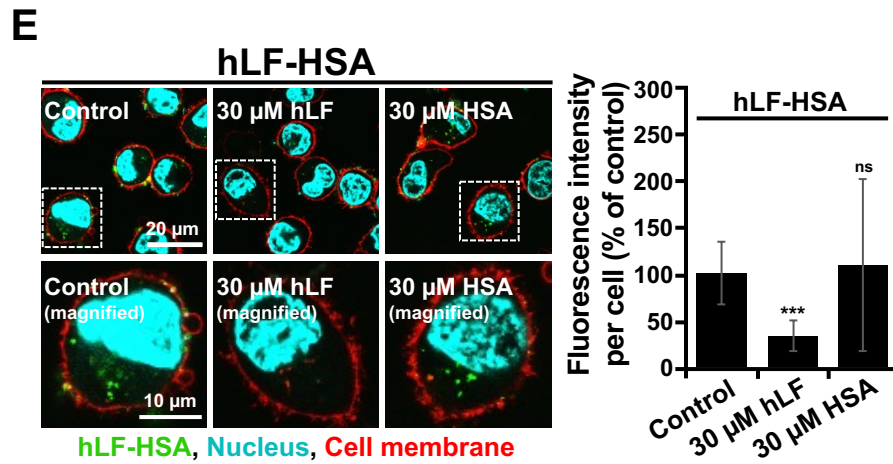


Fig. 2-8. hLF-HSA の細胞内取り込み及び増殖阻害活性に対する細胞表面上の GAGs 阻害の影響

(A) は、過剰量 (30 μ M) の HS、HP、HSA 又は hTF 非存在下と存在下の 0.1 μ M hLF の固相化された HS への結合試験の結果を示す。hTF はネガティブコントロールとして使用した。各サンプルは HS が固相化された ELISA プレートに 4 時間処理した。値は平均 \pm SD (n=3)で示した (ns, not significant; *** p <0.001)。(B) は、免疫染色法を用いた 0.38 μ M GAGs [HS (左)、HP (右)] 非存在下と存在下の 0.38 μ M hLF 又は hLF-HSA の細胞内取り込み画像を示す。hLF は PC-14 細胞に 1 時間処理した。1 次抗体として抗 hLF 抗体を使用した。赤は各タンパク質、青は細胞核を示す。(C) は、3.4 μ M HP 非存在下と存在下の 5 μ M hLF-HSA の細胞増殖試験の結果を示す。hLF-HSA は PC-14 細胞に 72 時間処理した。値は平均 \pm SD (n=3)で示した (ns, not significant; ** p <0.01)。(D) は、免疫染色法を用いた 1 mM NaClO₃ 非存在下と存在下の 0.38 μ M hLF 又は hLF-HSA の細胞内取り込み画像を示す。hLF-HSA は PC-14 細

胞に1時間処理した。1次抗体として抗hLF抗体を使用した。赤は各タンパク質、青は細胞核を示す。(E)は、過剰量(30 μ M)のhLF又はHSA非存在下と存在下の0.3 μ M蛍光標識hLF-HSAの細胞内取り込み画像を示す。蛍光標識hLF-HSAはPC-14細胞に1時間処理した。緑は蛍光標識hLF-HSA、青は細胞核、赤は細胞膜を示す。細胞内取り込み画像の右には、細胞内の蛍光強度をImageJで解析し、値は平均 \pm SD(n=50)で示した(ns, not significant; ** $p < 0.01$)。 (F)は、過剰量(30 μ M)のhLF、HSA又はhTF非存在下と存在下の5 μ M hLF-HSAの細胞増殖試験の結果を示す。hTFはネガティブコントロールとして使用した。hLF-HSAはPC-14細胞に72時間処理した。値は平均 \pm SD(n=3)で示した。

第7項 HSAの細胞内取り込みに対するGAGs阻害剤の影響

PC-14細胞に対して、HSAはほとんどカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナルを活性化しないことが示された(Fig. 2-4B, 2-6)。その原因としては、負に帯電したHSA [150]と負に帯電した細胞表面GAGs [151]との間に生じる静電的反発がその原因の一つであると考えた。この仮説を検証するため、細胞表面GAGsの硫酸基の負電荷を減少させたNaClO₃処理細胞を用いて、HSAの細胞内取り込みをウエスタンブロッティング法及び免疫染色法で半定量した。その結果、細胞内に取り込まれるHSA量は、NaClO₃の濃度依存的に増加することがウエスタンブロッティング法で示された(Fig. 2-9A)。さらに、免疫染色法でもNaClO₃処理細胞におけるHSAの取り込み量の増加が確認された(Fig. 2-9B)。これらの結果は、負に帯電したHSAと負に帯電した細胞表面GAGsとの間の静電反発が、低いHSAのカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナル及び細胞内取り込みの原因の一つであることを示している。

アルブミン結合ナノ粒子製剤では、がん細胞に対する集積性を高める目的で、HSAの表面を陽イオン化する試みが報告されており、その陽イオン化はがん細胞へのナノ粒子の細胞内取り込みを改善することが示されている [152]。しかし、

HSA をがん細胞へのキャリアとして用いる場合、HSA の陽イオン化のための表面修飾は、gp60 などの関連する受容体に対する親和性を低下させる可能性が懸念される。一方、hLF-HSA の場合は、HSA の活性が保たれたため (Fig. 2-6)、HSA への hLF の融合は、細胞内送達のための有効な手段であると考えられる。アルブミン結合ナノ粒子製剤ががん細胞に集積する考察としては、HSA をナノ粒子化することで第 1 章 第 3 節 第 2 項で示したように、高い EPR 効果が働いているのではないかと考えられる。

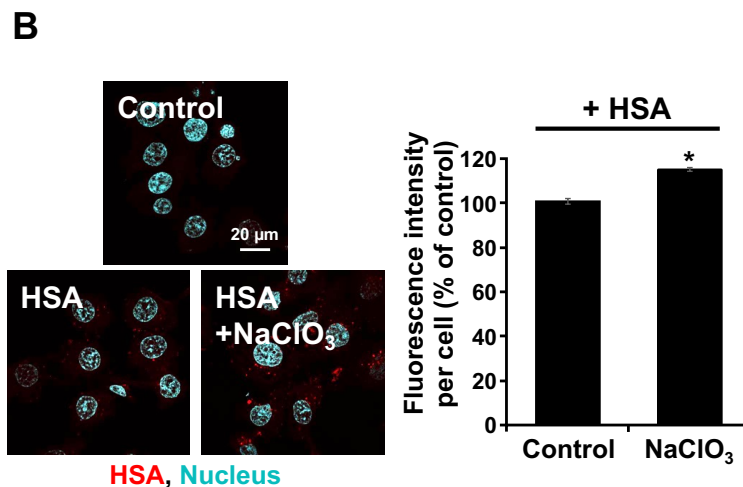
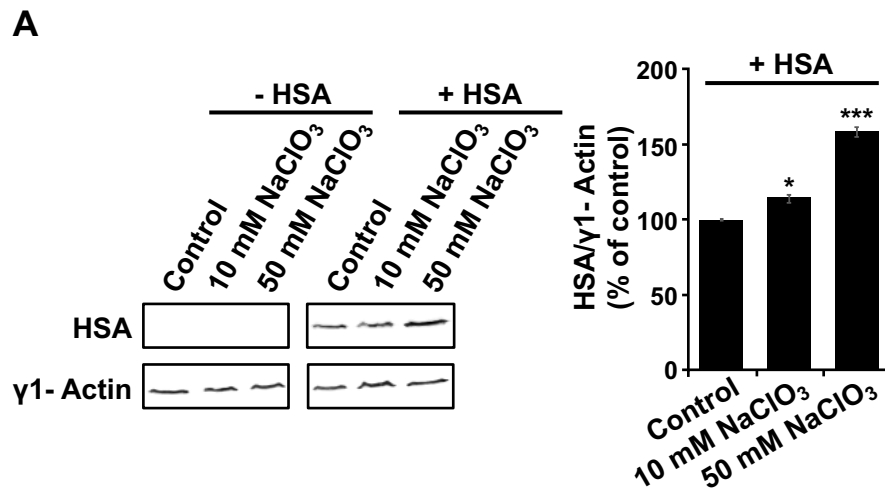


Fig. 2-9. HSA の細胞内取り込みに対する GAGs 阻害剤の影響

(A) は、5 μ M HSA を 1 時間処理した細胞溶解液の HSA 及び γ 1-Actin に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。 γ 1-Actin は、ローディングコントロールとして使用した。右には、検出された HSA と γ 1-Actin のバンドの蛍光強度を ImageJ で解析し、それらの値の比を用いて算出した。算出値は平均 \pm SD (n=3)で示した (* p <0.05; *** p <0.001)。(B) 免疫染色法を用いた 50 mM NaClO₃ 非存在下と存在下の 50 μ M HSA の細胞内取り込み画像を示す。HSA は PC-14 細胞に 1 時間処理した。1 次抗体として抗 HSA 抗体を使用した。赤は HSA、青は細胞核を示す。細胞内取り込み画像の右には、細胞内の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均 \pm SD (n=50)で示した (* p <0.05)。

第 8 項 hLF-HSA の細胞内取り込みメカニズム

Fig. 2-10 は、本研究で明らかとなった hLF-HSA の細胞内取り込みメカニズムを示す。hLF 単独を添加した場合、hLF は細胞膜表面に発現する sGAG との静電的な相互作用により細胞膜に局在する (Fig. 2-8A, B, 2-10A)。負に帯電したタンパク質である HSA は、負に帯電した細胞表面 GAGs との静電反発のために細胞表面に集積しにくく (Fig. 2-9)、その結果、細胞表面レセプター gp60 によるカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナル伝達の活性化が効率的に行われないと考えられる (Fig. 2-6, 2-9, 2-10B)。対照的に、hLF-HSA は hLF と GAG の相互作用を介して細胞表面にリクルートされ、HSA 受容体 gp60 への結合が可能となり、それによってカベオラ依存性エンドサイトーシスが効率的に活性化されたと考えられる (Fig. 2-4A, B, 2-6, 2-10C)。最終的に、hLF が細胞内に送達されることで、その増殖阻害活性が発現されたと考えられる (Fig. 2-10D)。

FDA で承認されたアルブミンベースの抗がん剤は、第 1 章 3 節 5 項で述べたわずか 2 品目のみであり、腫瘍の標的化が不十分である可能性が指摘されている [88, 90]。本研究で明らかにされたように、HSA 単独によるエンドサイトーシスシグナルは微弱で、HSA はがん細胞内に取り込まれにくい (Fig. 2-4B, 2-6) という課題から

前述した可能性が指摘されているのではないかと推察される。その課題に対して、本研究の検討過程で、hLFのような細胞表面に集積する物質と HSA との融合が、それらの細胞内取り込みを促進するという解決策を見出した。したがって、HSAの代用として、hLF-HSA をキャリアとして用いるナノ粒子は、効率的な抗がん剤として機能することが期待される。また、第1章第3節で述べたように、HSAは様々なリガンドと結合できる結合ポケットや薬剤と共有結合できるチオール基が存在する [68]。今後は hLF-HSA に対しても薬剤を結合できるのか検討していきたい。

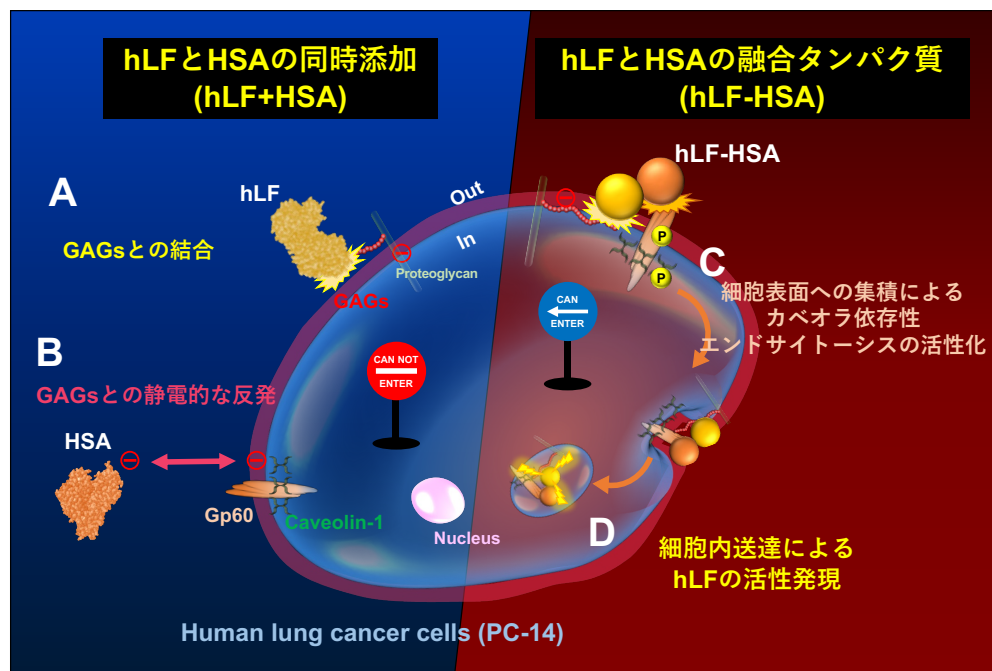


Fig. 2-10. hLF-HSA の細胞内取り込みメカニズム

第4節 結言

hLFは細胞内に取り込まれることで多くの活性を示すと考えられているが、実際にその関係に関しては明らかにされていない。DDSとして利用されているHSA融合技術を利用してhLFをがん細胞内に効率的に送達することに成功した。そして、hLFの細胞内取り込みと活性との相関性を明らかにした。さらに、本研究において明らかにされた、HSAをhLFと融合するがん細胞内取り込み促進技術は、薬物送達及びがん治療において効果的な戦略であることが示された。

第3章 HSA 融合による hLF の TGN pH 制御

第1節 緒言

前章では hLF に HSA を融合することで、hLF の細胞内送達が増進し、その低分化型ヒト肺腺がん細胞株 PC-14 に対する増殖阻害活性が高まることを示した。さらに、hLF-HSA の PC-14 細胞に対する細胞内取り込みメカニズムを明らかにした。本章では、HSA 融合技術によって細胞内に送達された hLF がどのようなメカニズムでがん細胞に対する増殖阻害活性を示しているのかを明らかにすることを目的とした。

当研究室では、hLF-HSA の細胞内取り込み機序を調べる過程で使用したマクロピノサイトーシス阻害剤 [5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA)] 処理によって、分化型ヒト肺腺がん細胞株 PC-9 に対する hLF-HSA の細胞増殖阻害活性が著しく減弱したことが示されている。しかしながら、種々のマクロピノサイトーシス阻害剤を用いた同様な解析では PC-9 細胞に対する hLF-HSA の増殖阻害活性へのマクロピノサイトーシスの関与は認められなかった。そこで、hLF-HSA の増殖阻害メカニズムとして、EIPA の阻害分子である Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE) に着目した。

NHE は生体膜を介して H^+ を輸送して細胞内 pH を制御する膜タンパク質であり、細胞内 pH の調節はがん細胞の生存に欠かせない。がん細胞において、細胞質 pH はその増殖を維持するためにアルカリ環境を維持している [101]。それは、細胞質 pH の上昇はがんの増悪化、転移の促進などがんにとって好都合に働くことに基づいている [104]。細胞内小器官には、それぞれ固有の酸性値があり、細胞内小器官 pH を維持することでその機能を正常に保つ [105]。細胞内小器官膜型 NHE7 は、TGN の酸性化の維持に関与し、その結果、ヒト膵臓がん細胞における細胞質のア

ルカリ性の維持に寄与していることが報告されている [5]。ヒト膵臓がん細胞における NHE7 のノックダウンはその増殖を抑制する。その一方で、非形質転換細胞においては細胞内 pH 及び細胞増殖に影響を示さない。このことから NHE7 は、創薬ターゲットとして注目されている。しかしながら、NHE7 の生物学的な意義や機能に関しては、がん細胞株ごとの H⁺ 輸送方向の差異など不明な点が多く残されている。したがって、NHE7 の活性剤及び特異的な阻害剤が発見されることで、創薬としての更なる理解に繋がると考えられる。

本研究では、hLF-HSA のヒト肺腺がん細胞株 PC-9 に対する増殖阻害活性に NHE7 が関与しているかどうかを調査した。

第 2 節 実験方法

第 1 項 細胞培養

ヒト肺腺がん細胞株 PC-9 [免疫生物研究所] および膵管腺がん細胞株 MIA PaCa-2 [Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank] の培養には、10% (v/v) のウシ胎児血清 (FBS) を含む RPMI-1640 培地を使用した。細胞培養に関しては、第 2 章第 2 節 1 項と同様である。

第 2 項 タンパク質の調製

タンパク質の調製に関しては、第 2 章第 2 節第 2 項と同様である。

第 3 項 RNA 干渉 (Fig. 3-5A, B, C, D, 3-8A, B)

RNA 干渉に関しては、第 2 章第 2 節第 4 項と同様である。siRNA 標的配列は以下の通りである。NHE7: センス 5'-CGA AGU CUG CUU GAC UGC AAC CUC A-3';

アンチセンス: 5'-UGA GGU UGC AGU CAA GCA GAC UUC G-3'. NHE1: センス 5'-GAU AGG UUU CCA UGU GAU C-3'; アンチセンス: 5'- GAU CAC AUG GAA ACC UAU C-3' [122]。各 Figure での播種細胞数を以下に示した。Fig. 3-7A, 3-10A の場合、24 ウェル培養プレートに細胞を 1.2×10^6 cells / well の密度で播種した。Fig. 3-7B, D, 3-10B の場合、96 ウェルイメージングガラス底マイクロプレートに細胞を 1.0×10^4 cells / well の密度で播種した。Fig. 3-7C の場合、96 ウェル培養プレートに細胞を 7.5×10^3 cells / well の密度で細胞を播種した。

第 4 項 免疫蛍光染色法による細胞内取り込み (Fig. 3-2A, B, C, 3-5A, B, 3-7D)

免疫蛍光染色に関しては、第 2 章 第 2 節 第 5 項と同様である。各 Figure の追加条件を以下に示した。使用した抗体に関しては Table. 3-1 に示した。

Fig. 3-2A の場合、PC-9 細胞に対し、試験培地として $0.38 \mu\text{M}$ の hLF、HSA、hLF+HSA 又は hLF-HSA を含む RPMI-1640+10% FBS を使用した。

Fig. 3-2B, C の場合、PC-9 細胞を 5 mM M β CD 又は $5 \mu\text{M}$ Genistin を含む RPMI-1640+10% FBS $100 \mu\text{l/well}$ で 30 分前培養した。前処理後、試験培地として各阻害剤及び $0.38 \mu\text{M}$ hLF-HSA を含む RPMI-1640+10% FBS を使用した。

Fig. 3-5A, B の場合、PC-9 細胞を $1.25 \mu\text{M}$ Okadaic acid を含む RPMI-1640 で 30 分前処理してから、試験培地である $1.25 \mu\text{M}$ Okadaic acid と $0.38 \mu\text{M}$ hLF 又は $50 \mu\text{M}$ HSA を含む RPMI-1640 で 1 時間処理した。

Fig. 3-7D の場合、96 ウェルイメージングガラス底マイクロプレート上で 48 時間培養された NHE7 をノックダウンした PC-9 細胞に試験培地を添加した。試験培地として $0.38 \mu\text{M}$ hLF-HSA を含む RPMI-1640+10% FBS を使用した。

Table. 3-1. 免疫蛍光染色に使用した抗体一覧

抗体	メーカーとカタログ番号	希釈倍率
anti-hLF rabbit antibody	BETHYL, A80-144A	1:500
anti-rabbit IgG (H+L) Alexa fluor 546 conjugated antibody	Invitrogen, A11010	1:200

第 5 項 蛍光 pH プロブを用いた細胞内 pH 試験 (Fig. 3-3A, B, 3-4A, B, 3-5C, D, 3-6, 3-7B, 3-10B, D, E)

細胞質 pH は、蛍光 pH 特異的プロブ BCECF-AM (pKa : 6.98、測定範囲は 6.0-8.0) [DOJINDO]を用いて検出した [153]。酸性細胞内小器官の pH は LysoSensor Green DND-189 (DND-189、pKa: 5.2、作動範囲は 4.5-6.0) [Thermo Fisher Scientific]を用いて検出した [154]。0.1% 豚ゼラチン溶液 100 μ l/well で 1 時間コートした 96 ウェルイメージングガラス底マイクロプレートに、細胞を 1×10^4 cells/well の密度で播種し、一晩培養した。その後、試験培地に交換し 8 時間培養した。培養後、1 μ M BCECF-AM 又は DND-189 を含む RPMI-1640 培地に交換し、30 分間培養した。共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて細胞の緑色蛍光を画像化した。検出されたデータを解析ソフト ImageJ で解析した。ImageJ の自由型ツールを用いて細胞領域をマニュアルで囲い、輝度値を算出した (Fig. 3-1)。棒グラフは、細胞 1 つ当たりの輝度値の平均値 (n=50) を使用し、コントロールを 100% とした。各 Figure の追加条件を以下に示した。

Fig. 3-3A, B の場合、PC-9 細胞に対し、試験培地として 10 μ M hLF, HSA, hLF+HSA 又は hLF-HSA を含む RPMI-1640 を使用した。

Fig. 3-4A, B の場合、PC-9 細胞に対し、試験培地として 10 μ M hLF-HSA と 5 mM M β CD 又は 5 μ M Genistin を含む RPMI-1640 を使用した。

Fig. 3-5C, D の場合、PC-9 細胞に対し、試験培地として 10 μ M hLF 又は 50 μ M HSA と 1.25 μ M Okadaic acid を含む RPMI-1640 を使用した。

Fig. 3-6 の場合、PC-9 細胞に対し、試験培地として 10 μ M hLF-HSA と 5 μ M EIPA (NHE 阻害剤、マクロピノサイトーシス阻害剤) [Cayman CHEMICAL] を含む RPMI-1640 を使用した。EIPA の溶媒には DMSO を使用し、コントロールを含むすべてのサンプルは、最終的に 1% DMSO を含む条件で調製された。

Fig. 3-7B の場合、96 ウェルイメージングガラス底マイクロプレート上で 48 時間培養された NHE をロックダウンした PC-9 細胞に試験培地を添加した。試験培地として 10 μ M hLF-HSA を含む RPMI-1640 を使用した。

Fig. 3-10B の場合、96 ウェルイメージングガラス底マイクロプレート上で 48 時間培養された NHE7 をロックダウン細胞した MIA PaCa-2 細胞に試験培地を添加し、4 時間培養した。試験培地として 10 μ M hLF-HSA を含む RPMI-1640 を使用した。

Fig. 3-10D, E の場合、MIA PaCa-2 細胞に対し、試験培地として 10 μ M hLF 又は 50 μ M HSA と 1.25 μ M Okadaic acid を含む RPMI-1640 を使用した。

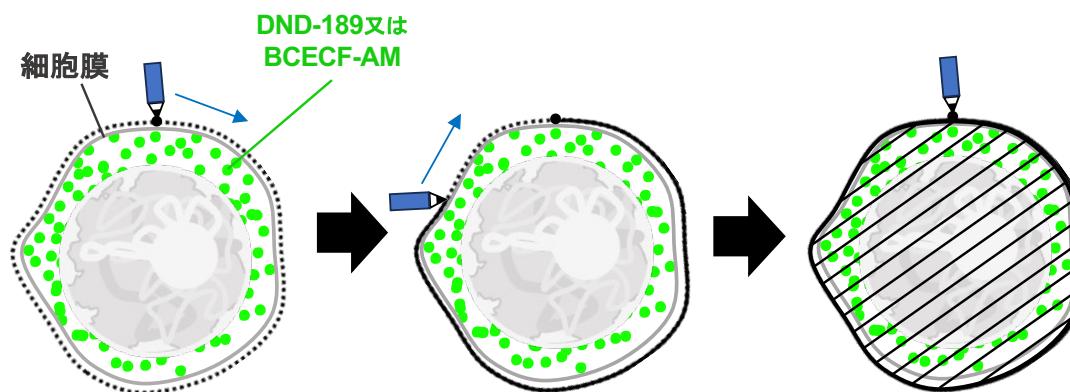


Fig. 3-1. 細胞領域の解析方法とその定義

WGA を使用していない場合、明視野画像を用いて細胞膜を確認し、その外側を ImageJ の自由ツールを用いて囲い、黒い斜線部を細胞内領域と定義して解析した。

第 6 項 細胞増殖試験 (Fig. 3-7C, 3-8C)

細胞増殖試験に関しては、第 2 章 第 2 節 第 6 項と同様である。各 Figure の追加条件を以下に示した。

Fig. 3-7C の場合、96 ウェル培養プレート上で 48 時間培養された NHE をノックダウンした PC-9 細胞を 10 μ M hLF-HSA を含む RPMI-1640+10% FBS で 48 時間培養した。

Fig. 3-8C の場合、MIA PaCa-2 細胞に対し、試験培地として 1、5 又は 10 μ M hLF-HSA を含む RPMI-1640+10% FBS を使用した。

第 7 項 ウェスタンブロッティング (Fig. 3-7A, 3-8A, 3-10A)

ウェスタンブロッティングに関しては、第 2 章 第 2 節 第 7 項と同様である。各 Figure の追加条件を以下に示した。使用した抗体やブロッキングバッファー、発光試薬に関しては **Table. 3-2** に示した。

Fig. 3-7A の場合、24 ウェル培養プレート上で 48 時間培養された NHE をノックダウンした PC-9 細胞を使用した。

Fig. 3-8A の場合、細胞を 10 μ M hLF、HSA、hLF+HSA 又は hLF-HSA を含む RPMI-1640+ 10% FBS で 48 時間処理した PC-9 細胞を使用した。

Fig. 3-10A の場合、24 ウェル培養プレート上で 48 時間培養された NHE をノックダウンした MIA PaCa-2 細胞を使用した。

Table. 3-2. ウェスタンブロットティングに使用した抗体一覧

抗体	メーカーとカタログ番号	希釈倍率	ブロッキングバッファー	発光試薬
anti-NHE7 rabbit antibody	abcam, AB272649	1:2,000	5% Skim milk in TBST	Immunostar LD
anti-NHE1 rabbit antibody	Sigma, MAB3140	1:2,000	2% Skim milk in TBST	Immunostar Zeta
anti-γ1 Acin mouse antibody	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 15903-1-AP	1:5,000	2% Skim milk in TBST	Immunostar Zeta
anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody	Promega Corporation, 65-6120	1:10,000	2% Skim milk in TBST	—
anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody	Promega Corporation, W4021	1:10,000	2% Skim milk in TBST	—

第 8 項 Alexa fluor488-標識タンパク質及び細胞内小器官マーカーを用いた免疫蛍光染色 (Fig. 3-7)

Alexa fluor488-標識タンパク質及び細胞内小器官マーカーを用いた免疫蛍光染色 (Fig. 3-7) に関しては、第 2 章 第 2 節 第 3 項及び第 2 章 第 2 節 第 5 項と同様である。使用した抗体に関しては Table. 3-3 に示した。

Table. 3-3. 細胞内小器官マーカーに対する抗体一覧

抗体	メーカーとカタログ番号	希釈倍率
anti-NHE7 rabbit antibody	abcam, AB272649	1:500
anti-TGN38 mouse antibody	NOVUS, NB300-575	1:200
anti-Rab5 rabbit antibody	Cell Signaling, C8B1	1:200
anti-Rab11A/B rabbit antibody	Proteintech, 15903-1-AP	1:200
anti-Rab7 rabbit antibody	Cell Signaling, D95F2	1:200
anti-rabbit IgG (H+L) Alexa fluor 546 conjugated antibody	Invitrogen, A11010	1:200
anti-mouse IgG (H+L) Alexa fluor 488 conjugated antibody	Invitrogen, A11001	1:200

第 9 項 統計解析

統計解析はすべて EZR ソフトウェアを用いて行った。すべてのデータは平均値±標準偏差 (SD) で示した。統計的に有意な差は、対になっていない Student-t 検定 (Fig. 3-2B, C, 3-5A, B, 3-7D)、Dunnnett 検定 (Fig. 3-3A, B, 3-8B, C, 3-10C)、Tukey の検定 (Fig. 3-7A) を用いた。更に、薬剤 2 剤の交互効果を考慮するために、二元配置分散分析して交互作用が認められた場合は Tukey 検定 (Fig. 3-6, 3-7B, 3-10B)、認められなかった場合は対になっていない Student-t 検定 (Fig. 3-4A, B, 3-5C, D, 3-10D, E) を用いて決定した。 p 値 <0.05 は統計的に有意な差とみなした。

第3節 結果・考察

第1項 ヒト肺線がん細胞株 PC-9 における hLF-HSA の細胞内取り込みに対するカベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害剤の影響

第2章では、hLF-HSA が、低分化型ヒト肺腺がん細胞株がん PC-14 細胞に対して細胞内に取り込まれ、増強した増殖阻害活性を示すことを明らかにした。hLF-HSA は PC-14 細胞だけではなく、分化度の異なる分化型ヒト肺腺がん細胞株 PC-9 細胞においても増殖阻害活性を示す [3]。ここでは、hLF-HSA の汎用性を確認するために、hLF-HSA の増殖阻害活性が確認されている PC-9 細胞においても同様な機序で細胞内に取り込まれているかどうかを調べた。PC-9 細胞に hLF 又は hLF と HSA を同時添加すると、PC-14 細胞と同様に、hLF は細胞表面に集積し、hLF-HSA は細胞内に輸送された (Fig. 3-2A)。PC-9 細胞における hLF-HSA の細胞内取り込み経路を確認するために、カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤を用いた。PC-9 細胞に対してカベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害剤である M β CD 及び Genistin で処理すると hLF-HSA の細胞内取り込みは阻害された (Fig. 3-2B, C)。これらの結果から、hLF-HSA は主にカベオラ依存性エンドサイトーシスを介して PC-9 細胞に取り込まれることが確認された。

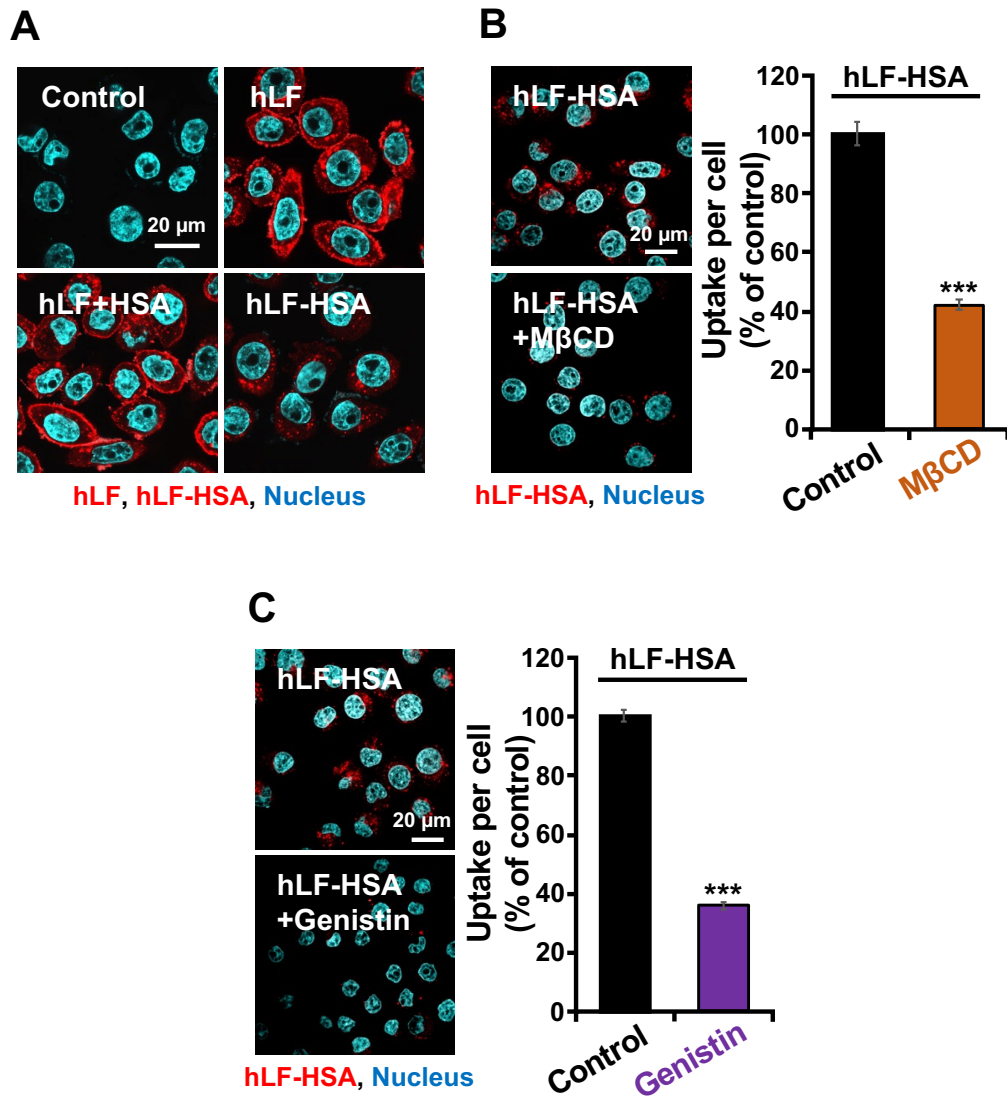


Fig. 3-2. hLF-HSA による細胞内小器官のアルカリ化に対するカベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤の影響

(A) は、免疫染色法を用いた 0.38 μ M hLF、HSA、hLF と HSA の同時添加 (hLF+HSA) 又は hLF-HSA 細胞内取り込み画像を示す。各タンパク質は PC-9 細胞に 1 時間処理した。1 次抗体として抗 hLF 抗体を使用した。赤は各タンパク質、青は細胞核を示す。このデータは当研究室を 2020 年度に修了した笠間 諒也氏によって取得された。(B, C) は、免疫染色法を用いたカベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤 [5 mM M β CD (B)、5 μ M Genistin (C)] 非存在下と存在下の 0.38 μ M hLF-HSA の

細胞内取り込み画像を示す。hLF-HSA は PC-9 細胞に 1 時間処理した。1 次抗体として抗 hLF 抗体を使用した。赤は hLF-HSA、青は細胞核を示す。細胞内取り込み画像の右には、細胞内の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均±SD (n=50)で示した (ns, not significant; *** p<0.001)。

第 2 項 ヒト肺線がん細胞株 PC-9 における細胞内小器官 pH に対する hLF、HSA 又は hLF-HSA の影響

hLF-HSA の細胞内取り込み機序を調べる過程で使用した EIPA 処理によって、PC-9 細胞に対する hLF-HSA の細胞増殖阻害活性は著しく減弱した。本研究では、hLF-HSA の増殖阻害メカニズムとして、EIPA の阻害分子である NHE7 に着目した。NHE7 は細胞内小器官である TGN に発現しており、H⁺を輸送することでその pH を調節する。PC-9 細胞に取り込まれた hLF-HSA が、酸性細胞内小器官である TGN の pH に何らかの影響を及ぼすかどうかを評価した。その評価方法として、酸性細胞内小器官の pH を検出する蛍光 pH プローブ (DND-189) [153]を用いて評価した。この蛍光プローブは、酸性で高い蛍光強度が観察され、アルカリにシフトするにつれ蛍光強度が減弱する。コントロールで細胞内に蛍光が検出された(Fig. 3-3A, 左)。この蛍光プローブは pH 4.5 から 6.0 の主に細胞内小器官で機能する。細胞核は pH 7.4 であることから、細胞中央の蛍光の観察されない領域は細胞核であると考えられる。hLF、HSA、及び hLF と HSA の同時添加で処理した場合、コントロールと比較してその蛍光強度に影響は見られなかった。対照的に、hLF-HSA で処理した場合、蛍光の減弱が確認された。各サンプル処理による細胞内 pH の蛍光の強度を ImageJ で比較した。hLF、HSA、及び hLF と HSA の同時添加で処理した場合、コントロールと比較して統計的優位な差は見られなかったが、hLF-HSA 処理で優位な差が確認された (Fig. 3-3A, 右)。したがって、hLF-HSA 処理でコントロー

ルと比較して DND-189 の蛍光シグナルが減弱したことから、hLF-HSA は細胞小器官を正常な状態と比較してアルカリ化していることが示された。また、hLF-HSA 処理のみで細胞内小器官のアルカリ化が誘導されたことから、その効果を発揮するためには、hLF 又は HSA あるいは両方が細胞内への取り込まれることが重要であることを示している。

ヒト膵臓がん細胞において、TGN に局在する NHE7 は、細胞内小器官 pH だけでなく細胞質 pH にも影響を与えることから [5]、各サンプル (hLF、HSA、hLF と HSA の同時添加、hLF-HSA) 処理による PC-9 細胞の細胞質 pH への影響についても調査した。その評価方法として、細胞質 pH インジケーター (BCECF-AM) [154] を使用した。各サンプルで細胞を処理すると、それら全てで細胞質 pH が上昇した (**Fig. 3-3B**)。中でも hLF-HSA は、細胞質 pH を上昇させるのに最も効果的であった。hLF や HSA、hLF 及び HSA の同時添加が、細胞質をアルカリ化している原因については不明であるが、肺がん細胞においてそれらのタンパク質は、細胞増殖に影響を与えなかったため、細胞質をアルカリ化するのではなく、hLF-HSA がもたらした細胞内小器官のアルカリ化が肺がん治療に有効である可能性が考えられる。

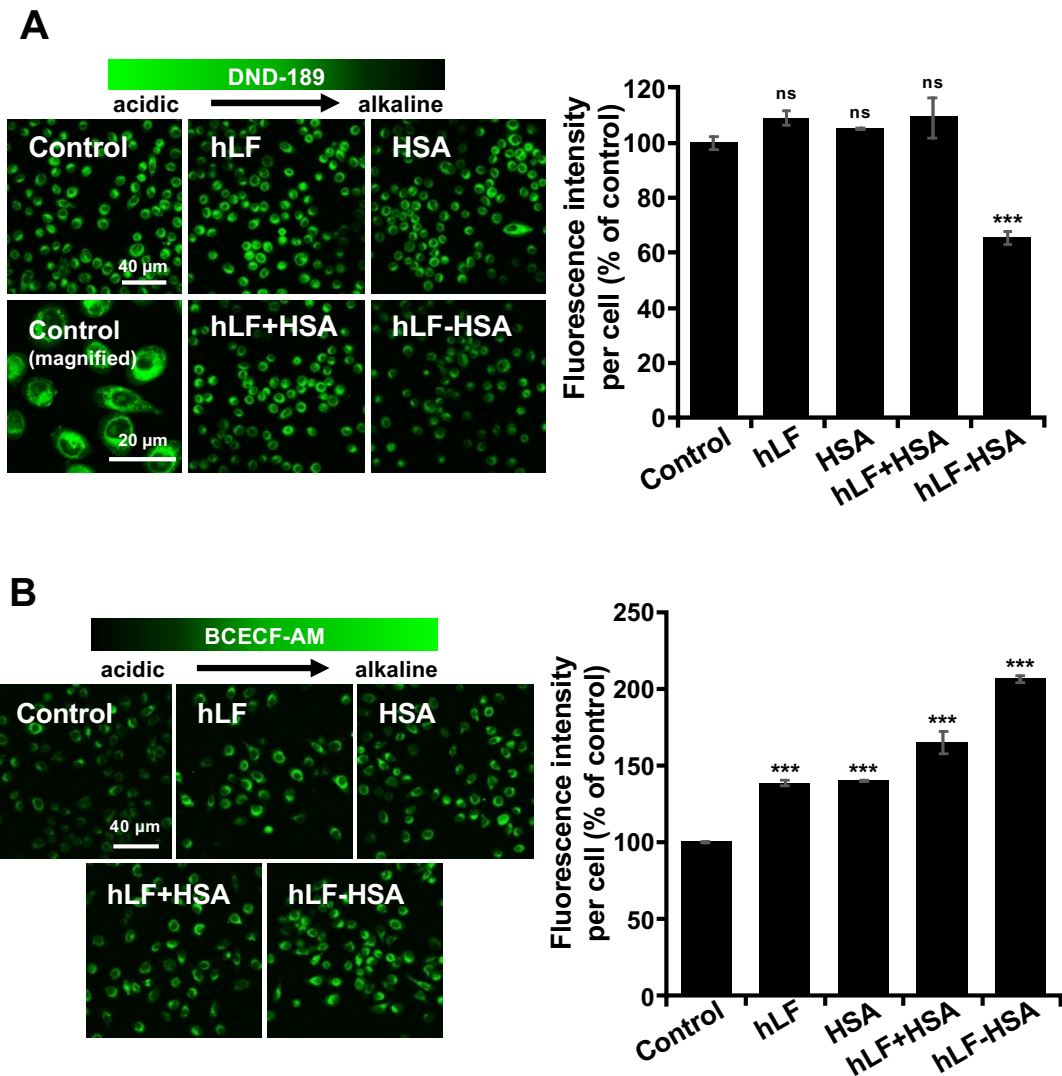


Fig. 3-3. ヒト肺線がん細胞株 PC-9 における細胞内小器官 pH 及び細胞質 pH に対する hLF、HSA 又は hLF-HSA の影響

(A, B) は、蛍光 pH プローブを用いた 10 μ M hLF、HSA、hLF+HSA 又は hLF-HSA の細胞内 pH 試験の結果を示す。各タンパク質は PC-9 細胞に 8 時間処理した。(A) は酸性細胞内小器官用の pH プローブ (DND-189)、(B) は細胞質用の pH プローブ (BCECF-AM) を使用した。細胞内 pH 試験の画像の右には、細胞の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均 \pm SD ($n=50$) で示した (ns, not significant; *** $p<0.001$)。

第3項 hLF-HSAによる細胞内小器官のアルカリ化に対するカベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤の影響

細胞内に取り込まれた hLF-HSA が細胞内小器官をアルカリ化している可能性を検証するために、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の阻害剤を用いた解析を行なった。M β CD 及び Genistin でカベオラ依存性エンドサイトーシスを阻害することで (Fig. 3-2B, C)、hLF-HSA によって誘導された細胞内小器官のアルカリ化は完全に消失した (Fig. 3-4A, B)。したがって、hLF-HSA による細胞内小器官のアルカリ化には、hLF-HSA が細胞内に取り込まれることが重要であることが示された。

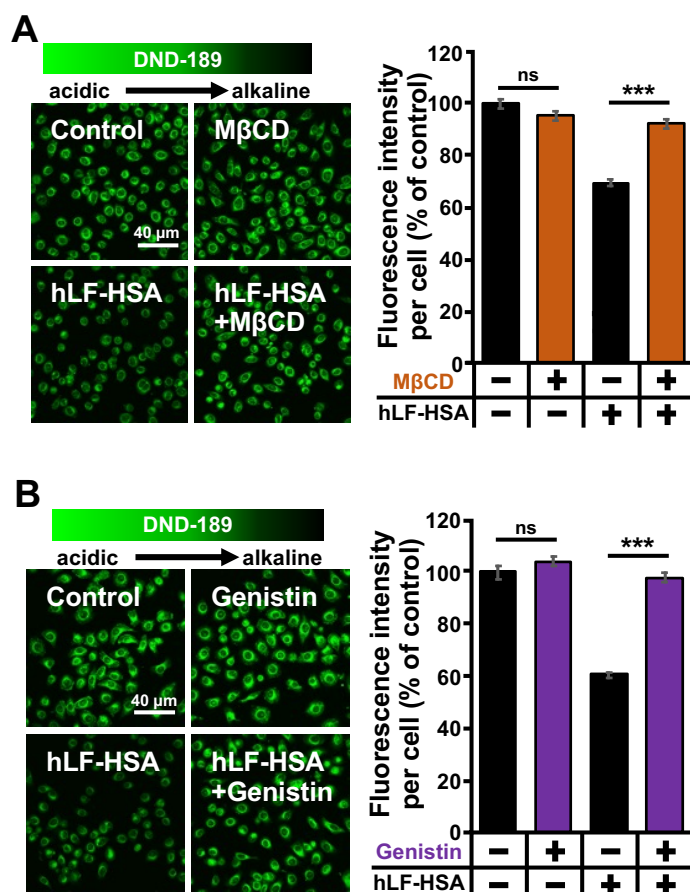


Fig. 3-4. hLF-HSA による細胞内小器官のアルカリ化に対するカベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤の影響

(A, B) は、5 mM M β CD (A)又は 5 μ M Genistin (B)非存在下と存在下の細胞内小器官用の蛍光 pH プローブ (DND-189)を用いた hLF-HSA の細胞内 pH 試験の結果を示す。hLF-HSA は PC-9 細胞に 8 時間処理した。細胞内 pH 試験の画像の右には、細胞の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均 \pm SD (n=50)で示した (ns, not significant; *** p<0.001)。

第 4 項 カベオラ依存性エンドサイトーシス活性剤を用いた hLF 又は HSA の細胞内導入による細胞内小器官 pH への影響

カベオラ依存性エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれた hLF-HSA は細胞内小器官をアルカリ化した (Fig. 3-3A)。細胞内に送達された hLF と HSA のどちらの分子が細胞内小器官のアルカリ化を誘導するのかを明らかにするために、カベオラ依存性エンドサイトーシス活性剤である Okadaic acid を用いて、hLF 又は HSA を強制的に細胞内送達した [135]。hLF は細胞内に取り込まれず細胞表面に集積したが、Okadaic acid で細胞を処理すると、hLF は細胞内に取り込まれた (Fig. 3-5A)。50 μ M 高濃度の HSA 単独は細胞内に取り込まれ、その取り込みは Okadaic acid 処理によって促進された (Fig. 3-5B)。したがって、カベオラ依存性エンドサイトーシスの活性化は、hLF 及び HSA の細胞内取り込みを促進可能であることが示された。次に、hLF と HSA の細胞内への送達が、細胞内小器官 pH に影響を与えるかどうかを検証した。Okadaic acid 処理によって hLF は細胞内小器官をアルカリ化した。HSA では観察されなかった (Fig. 3-5C, D)。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していることが示された。

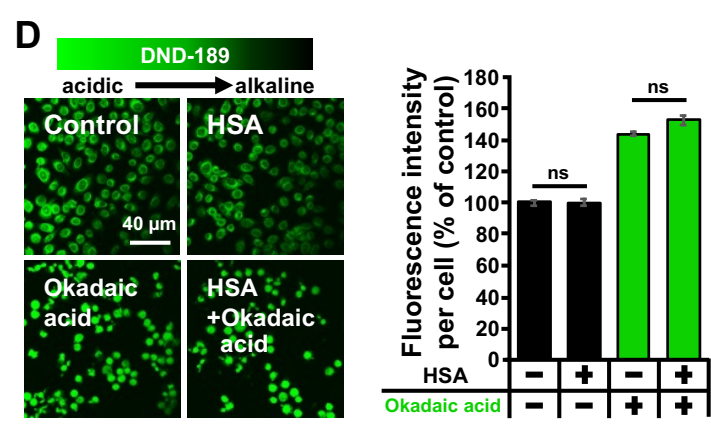
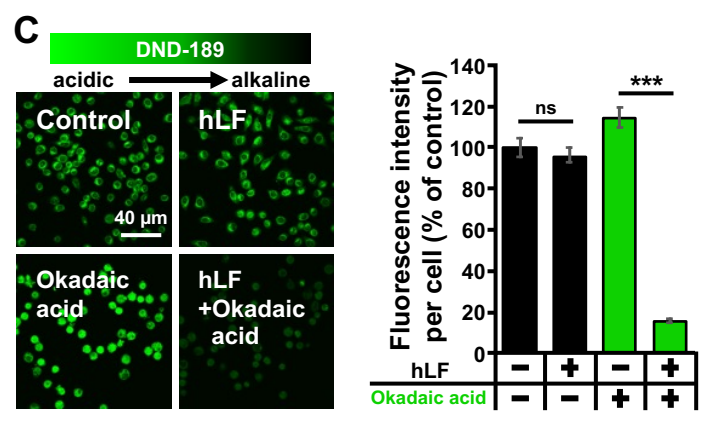
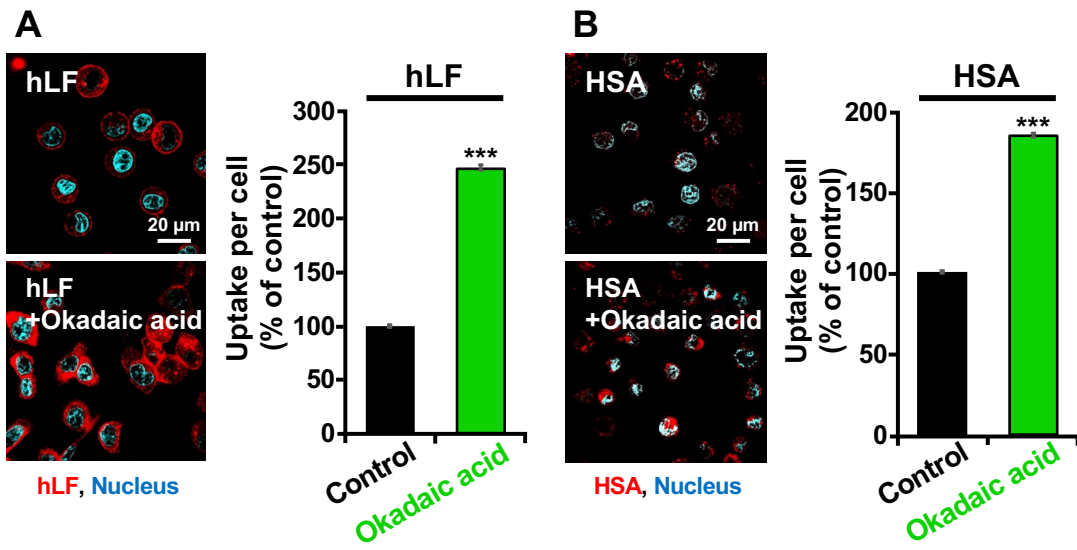


Fig. 3-5. カベオラ依存性エンドサイトーシス活性剤を用いた hLF 又は HSA の細胞内導入による細胞内小器官 pH への影響

(A, B) は、カベオラ依存性エンドサイトーシス活性剤 (1.25 μ M Okadaic acid) 非存在下と存在下の 0.38 μ M hLF 又は 50 μ M HSA の細胞内取り込み画像を示す。各タンパク質は PC-9 細胞に 1 時間処理した。赤は hLF 又は HSA、青は細胞核を示す。細胞内取り込み画像の右には、細胞内の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均 \pm SD (n=50) で示した (ns, not significant; *** p<0.001)。(C, D) は、1.25 μ M Okadaic acid 非存在下と存在下の DND-189 を用いた 10 μ M hLF 又は 50 μ M HSA の細胞内 pH 試験の結果を示す。各タンパク質は PC-9 細胞に 8 時間処理した。細胞内 pH 試験の画像の右には、細胞の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均 \pm SD (n=50) で示した (ns, not significant; *** p<0.001)。

第 5 項 hLF-HSA による細胞内小器官のアルカリ化に対する NHE 阻害剤の影響

細胞内小器官膜型 NHE は、細胞内小器官の機能に重要な酸性環境を維持する調節因子として知られている [116, 119]。まず、NHE の阻害剤 EIPA を用い [123]、PC-9 細胞における細胞内小器官 pH の変化を調べた。EIPA による NHE 機能の阻害は、DND-189 によって検出されたように、細胞内小器官の酸性化をもたらした (Fig. 3-6)。このことは、PC-9 細胞では、細胞内小器官の NHE が主に H⁺ を放出する輸送体として機能することを示唆している。hLF-HSA によって誘導された細胞内小器官 pH の上昇は、EIPA の添加によって低下した。以上より、hLF-HSA は NHE の活性化因子として作用する可能性が示された。

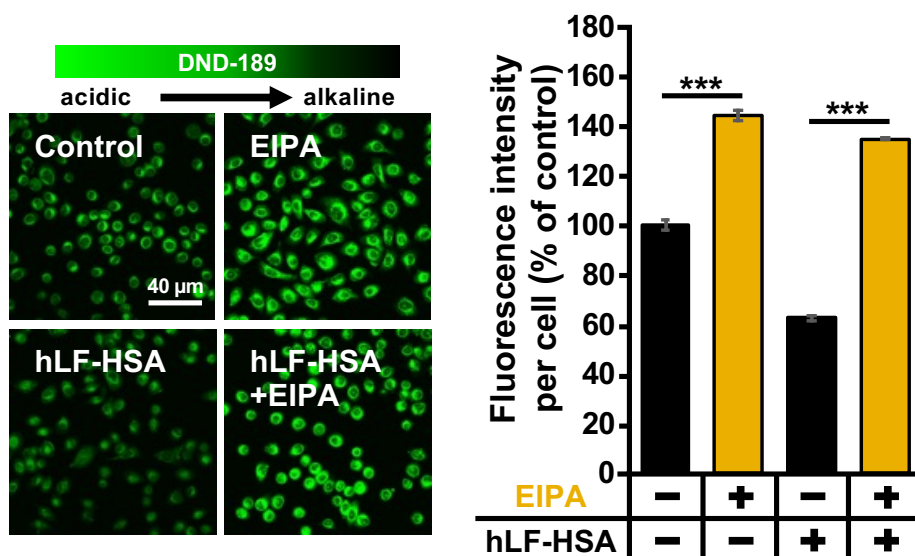


Fig. 3-6. hLF-HSA による細胞内小器官のアルカリ化及び増殖阻害に対する NHE 阻害剤の影響

NHE 阻害剤 (5 μM EIPA) 非存在下と存在下の DND-189 を用いた 10 μM hLF-HSA の細胞内 pH 試験の結果を示す。hLF-HSA は PC-9 細胞に 8 時間処理した。細胞内 pH 試験の画像の右には、細胞の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均±SD (n=50) で示した (***) p<0.001)。

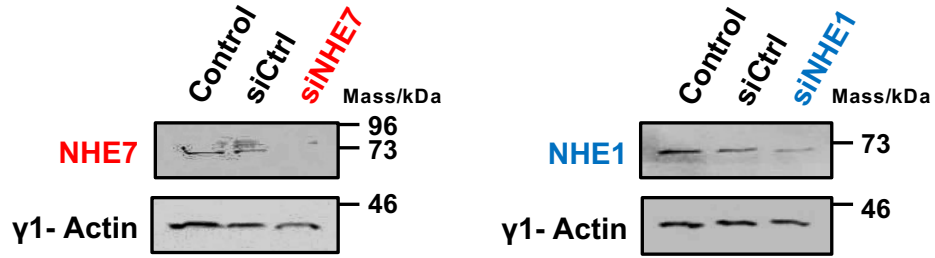
第 6 項 hLF-HSA による細胞内小器官のアルカリ化及び増殖阻害に対する NHE7 又は NHE1 ノックダウンの影響

細胞内小器官膜型 NHE には異なるアイソフォームが存在しており、NHE 阻害剤 EIPA の各アイソフォームに対する選択性は低い [117]。したがって、本研究で注目している細胞内小器官膜型 NHE7 の hLF-HSA の機能に対する関与を明らかにするために、RNA 干渉を適用した (Fig. 3-7A)。PC-9 細胞に発現する NHE7 をノックダウンすると、細胞内小器官の酸性化を生じたが (Fig. 3-7B-1)、細胞膜に局在し機能する NHE1 [127] はそのような変化を示さなかった (Fig. 3-7B-2)。PC-9 細胞における NHE7 及び NHE1 のノックダウンは細胞増殖に影響を与えなかった (Fig. 3-7C-1,

C-2)。NHE7 のノックダウンは、NHE1 のノックダウンとは異なり、hLF-HSA による増殖阻害活性を抑制した (**Fig. 3-7C-1, C-2**)。このことは、NHE7 が PC-9 細胞における hLF-HSA の標的分子である可能性を示唆している。NHE7 はエンドサイトーシスの制御に関与することが報告されている [155]。しかし、NHE7 のノックダウンは、hLF-HSA の細胞内取り込みに有意な変化をもたらさなかった (**Fig. 3-7D**)。したがって、NHE7 ノックダウンによる hLF-HSA の活性抑制は、その細胞内取り込み阻害により引き起こされたものではなく、細胞内小器官 pH に対する作用により生じたものと示唆される。

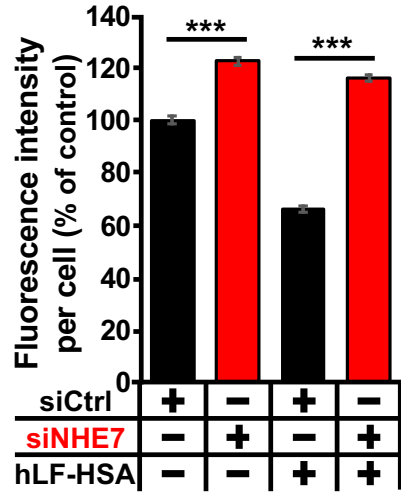
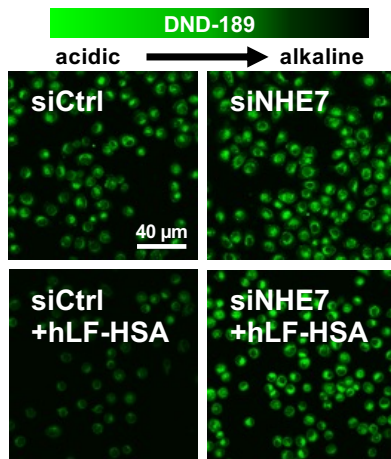
ヒト膵臓がん細胞では、NHE7 のノックダウンは、その増殖を抑制することが報告されているが [5]、ヒト肺がん細胞 PC-9 では増殖への影響は認められなかった。したがって、肺がん細胞においては、NHE7 は阻害するより、その機能を活性化することががん治療に有効である可能性が示された。まとめると、hLF-HSA のカベオラ依存的な細胞内輸送は、NHE7 の機能を活性化し、細胞内小器官の pH を上昇させることでその機能が阻害され、その後、細胞増殖阻害につながる可能性が示された。

A

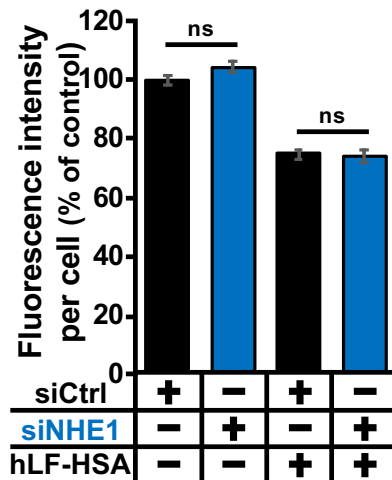
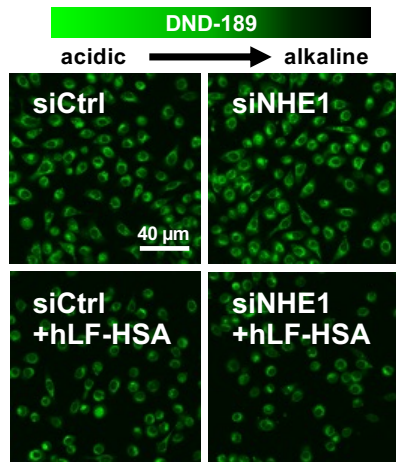


B

B-1



B-2



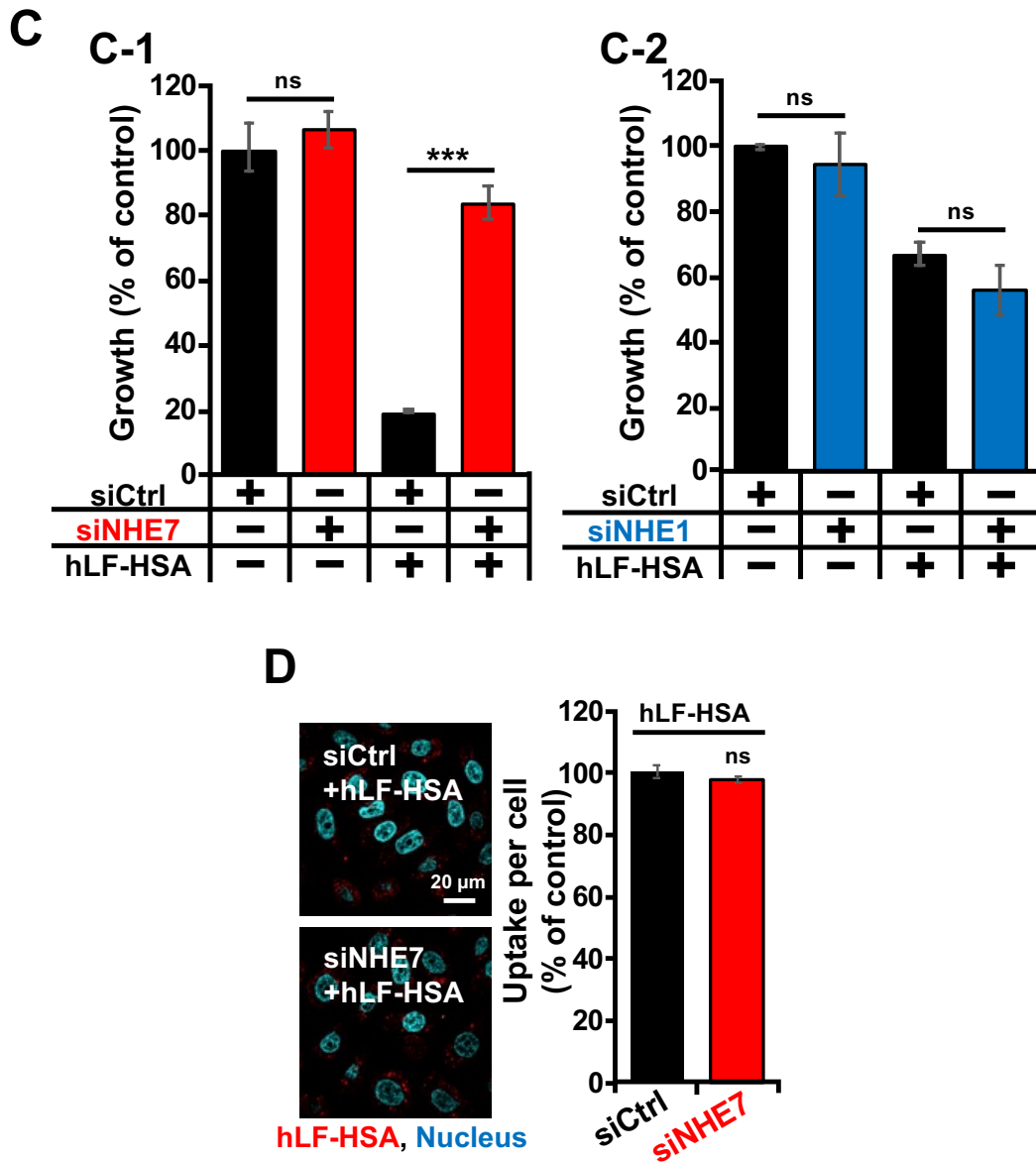


Fig. 3-7. hLF-HSA による細胞内小器官のアルカリ化及び増殖阻害に対する NHE7 又は NHE1 ノックダウンの影響

(A) は、NHE7、NHE1、 γ 1-Actin に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。 γ 1-Actin はローディングコントロールとして使用した。このデータは当研究室のトルン デイン ハウエアアン氏によって取得された。(B) は、NHE7 (B-1) 又は NHE1 (B-2) ノックダウン細胞における、10 μ M hLF-HSA の DND-189 を用いた

細胞内 pH 試験の結果を示す。hLF-HSA は PC-9 細胞に 8 時間処理した。細胞内 pH 試験の画像の右には、細胞の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均 ±SD (n=50) で示した (ns, not significant; *** p<0.001)。(C) は、NHE7 (C-1) 又は NHE1 (C-2) ノックダウン細胞における、10 μM hLF-HSA の細胞増殖試験の結果を示す。hLF-HSA は PC-9 細胞に 48 時間処理した。値は平均 ±SD (n=3) で示した (ns, not significant; *** p<0.001)。このデータは当研究室のトルン デイン ハウエーアン氏によって取得された。(D) は、NHE7 ノックダウン細胞における、免疫染色法を用いた 0.38 μM hLF-HSA の細胞内取り込み画像を示す。hLF-HSA は PC-9 細胞に 1 時間処理した。1 次抗体として抗 hLF 抗体を使用した。赤は hLF-HSA、青は細胞核を示す。細胞内取り込み画像の右には、細胞内の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均 ±SD (n=50) で示した (ns, not significant)。

第 7 項 hLF、HSA 又は hLF-HSA 処理による NHE7 又は NHE1 の発現量への影響

ある分子を活性化するために最もよく観察される現象は、その発現レベルを上昇させることである。したがって、hLF-HSA による NHE7 活性化のメカニズムを解析するために、当研究室のトルン デイン ハウエーアン氏によって、hLF-HSA 存在下での NHE7 の発現量への影響が調べられた (Fig. 3-6A)。その結果、hLF、HSA、hLF+HSA では NHE7 の発現量への影響はなかったが、hLF-HSA は NHE7 の発現量をコントロールと比較して 96% まで上昇させた (Fig. 3-6B)。この発現調節は NHE7 に特異的であり、NHE1 には影響を及ぼさなかった (Fig. 3-6C)。このことから、hLF-HSA は NHE7 の活性自体を活性化するのではなく、その発現レベルを上昇させることで細胞内小器官のアルカリ化を誘導していることが示された。この結果は、細胞内取り込みの結果と一致しており、hLF の細胞内への取り込みが活性発現に重要であることを示している。

この戦略に関する 1 つの懸念点は、乳がん MDA-MB 231 細胞における NHE7 過剰発現による細胞接着、浸潤、および足場非依存性増殖の増加を含む、がん悪性腫瘍の可能性の報告である [125]。さらに、NHE7 発現の上昇は、ヒト膵管腺がんの個体における予後不良と関連することも示されている [117]。しかし我々は、肺がん細胞株 (PC-9, PC-14, PC-3, A549)、前立腺がん細胞株 (DU-145)、黒色腫細胞株 (G361)、及び膵臓がん細胞株 (MIA PaCa-2, PANC-1) における、hLF-HSA の増殖阻害活性を確認している。対照的に、正常な肺線維芽細胞 (WI-38 及び IMR-90) などの非形質転換細胞は、この感受性を示さなかった [3]。したがって、hLF-HSA によって誘導される NHE7 発現上昇を介したがん細胞増殖阻害効果は、細胞内小器官 pH をターゲットとする新たながん治療戦略の可能性を示している。

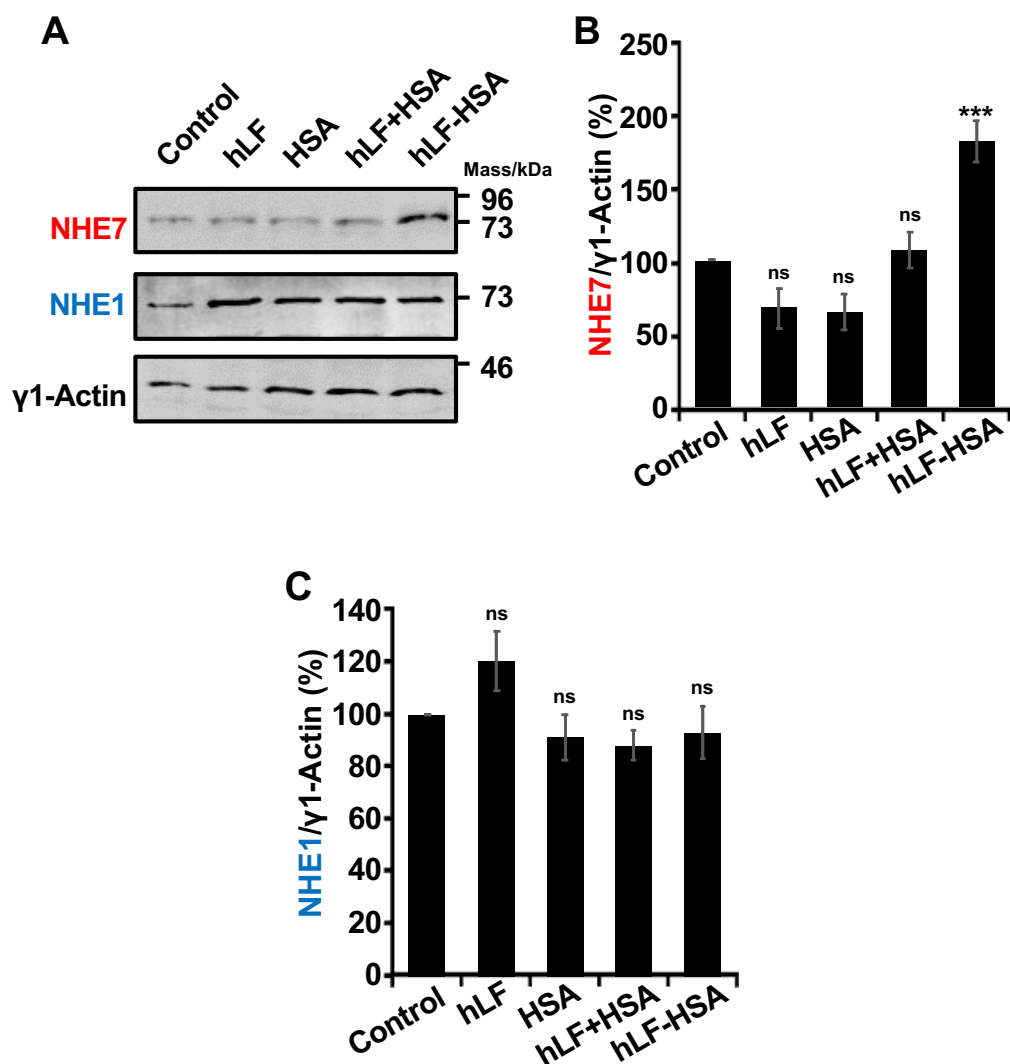


Fig. 3-8. hLF、HSA 又は hLF-HSA 処理による NHE7 又は NHE1 の発現量への影響

(A) は、濃度 10 μ M の各タンパク質を 48 時間処理した PC-9 細胞の細胞溶解液の NHE7、NHE1、 γ 1-Actin に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングで解析した結果を示す。 γ 1-Actin は、ローディングコントロールとして使用した。(B, C) は、(A) で検出された NHE7 又は NHE1 と γ 1-Actin のバンドの蛍光強度を ImageJ で解析し、それらの値の比を用いて算出した。算出値は平均 \pm SD (n=3) で示した (ns, not significant; *** p<0.001)。このデータは当研究室のトルンディンハウエーアン氏によって取得された。

第 8 項 hLF-HSA 及び NHE7 の細胞内局在

NHE7 の発現上昇メカニズムを明らかにするために、免疫蛍光染色法を用いて、PC-9 細胞における hLF-HSA の局在を調べた。hLF-HSA は、カベオラ依存性エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるため、まずはエンドソームマーカーを用いて hLF-HSA の細胞内局在を確認した。エンドソームマーカーとして、初期エンドソームマーカーである Rab5 [74, 75]、リサイクリングエンドソームマーカーである Rab11 [76]、及び後期エンドソームマーカーである Rab7 [74]を使用した。その結果、hLF-HSA は初期エンドソーム及びリサイクリングエンドソームに局在していたが、後期エンドソームには局在しないことが観察された (Fig. 3-9A, 3-9B, 3-9C)。hLF-HSA のこのようなエンドサイトーシス経路は、一般的な HSA 融合タンパク質と同様であった [156]。また、hLF-HSA は細胞核にほとんど局在していなかった。このことは、hLF-HSA が、直接の転写因子として機能して、NHE7 の発現量を制御していないことを示唆している。次に NHE7 は、TGN マーカーである TGN38 [157]との共局在により、報告通り TGN に発現していることが示された (Fig. 3-9D)。hLF-HSA と NHE7 との共局在を調べたところ、それらの共局在がほとんど観察されなかった。このことは、この 2 つの分子の間に直接的な相互作用がないことを示している (Fig. 3-9E)。したがって、hLF-HSA は、間接的に NHE7 の発現量を高めていることが考えられる。また、NHE7 は報告通り TGN に局在したことから (Fig. 3-9D)、hLF-HSA は TGN pH をアルカリ化することで、増殖阻害を示していると考えられる。今後は、既報 [5]を参考に、TGN に蓄積する β -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (gal-T)に mCherry と EGFP を融合した蛍光プローブ (GalT-mCherry-

EGFP)を細胞にトランスフェクションした評価系を PC-9 細胞に対して適用し、hLF-HSA が TGN 特異的に pH 変化を誘導しているかを評価したいと考えている。

NHE7 は主に TGN に発現する [121]。しかし Lin PJ によると、分泌輸送膜タンパク質 (SCAMPs)が NHE7 と直接相互作用し、NHE7 のリサイクリングエンドソームとトランスゴルジ網 (TGN)の間の輸送を制御することが示されており、NHE7 がエンドソームにも局在する可能性が示されている [158]。Fig. 3-9 で示されるように、hLF-HSA は初期エンドソームやリサイクリングエンドソームに局在することが示されたが、本研究の結果のみで hLF-HSA とエンドソームに局在する NHE7 との共局在を否定できない。したがって、今後は、様々なエンドソームマーカーを使用や NHE7 と hLF-HSA とのプルダウンアッセイによってそれらの相互作用を詳細に解析していく必要がある。hLF-HSA によって誘導される発現上昇の原因となるメカニズムを解明するには、さらなる調査が必要である。本論文では、hLF-HSA が NHE7 の発現量を上昇させることで TGN のアルカリ化を誘導したと考察したが、hLF-HSA が NHE7 の分解機構を阻害している可能性も考えられる。今後は、hLF-HSA が NHE7 を転写レベルで増幅しているかどうかを mRNA 解析により特定することで前述した可能性を検証できると考えている。

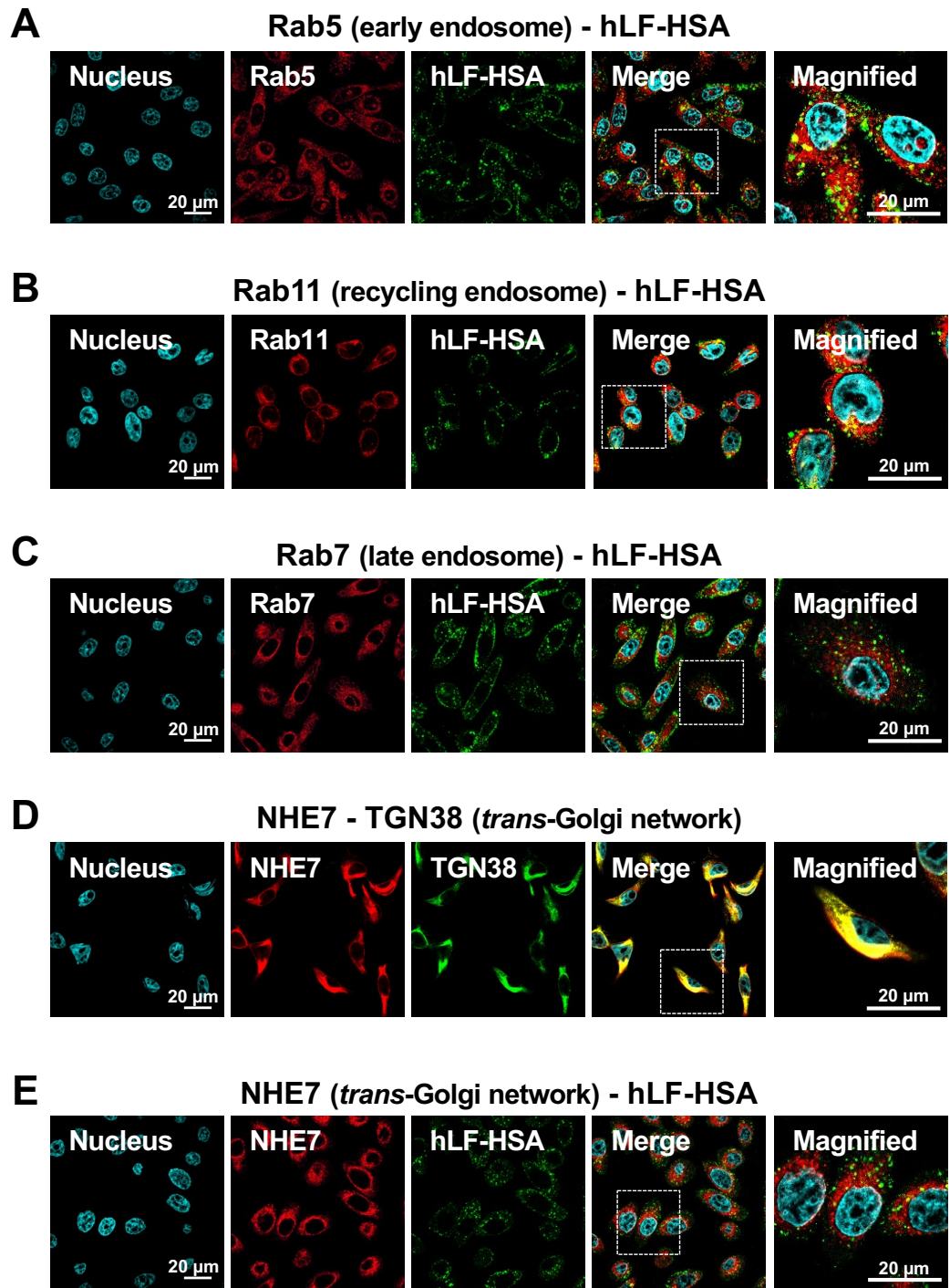


Fig. 3-9. hLF-HSA 及び NHE7 の細胞内局在

(A-C) 赤は Rab5 [初期エンドソームマーカー (A)], Rab11 [リサイクリングエンドソームマーカー (B)], Rab7 [後期エンドソームマーカー (C)], 緑は 0.3 μ M 蛍光標識 hLF-HSA、青は細胞核を示す。蛍光標識 hLF-HSA は PC-9 細胞に 1 時間処理した。(D) は、NHE7 (赤) と TGN38 (緑、TGN マーカー) の共局在画像を示す。青は細胞核を示す。(E) 赤は NHE7、緑は 0.3 μ M 蛍光標識 hLF-HSA、青は細胞核を示す。蛍光標識 hLF-HSA は PC-9 細胞に 1 時間処理した。

第9項 ヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 における細胞内小器官 pH に対する hLF-HSA 及び NHE7 ノックダウンの影響

ヒト肺線がん細胞株 PC-9 における NHE7 の H⁺ の放出機能とは異なり (Fig. 3-7B-1)、ヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 における NHE7 は H⁺ を細胞質から TGN に輸送することが報告されている [5]。PC-9 細胞で観察されたように、hLF-HSA が MIA PaCa-2 細胞においても NHE7 を介した細胞内小器官の pH 変化をもたらすかどうかを確認するために、DND-189 を用いて細胞内小器官 pH を調べた。以前の報告と一致して、NHE7 のノックダウン (Fig. 3-10A) は、細胞内小器官のアルカリ化をもたらした (Fig. 3-10B)。一方、hLF-HSA は MIA PaCa-2 細胞において細胞内小器官の酸性化を誘導した (Fig. 3-10B)。この hLF-HSA によって誘導された細胞内小器官の酸性化は、NHE7 をノックダウンすることで抑制された (Fig. 3-10B)。また、細胞増殖試験では、hLF-HSA は MIA PaCa-2 細胞の増殖を濃度依存的に阻害することが示された (Fig. 3-10C)。さらに、Okadaic acid を用いて hLF を単独で細胞内に導入すると、細胞内小器官の酸性化が生じたが、HSA では生じないことを見出した (Fig. 3-10D, 3-10E)。以上より、細胞内に送達された hLF は、ヒト膵臓がん MIA PaCa-2 細胞においても NHE7 の発現量を上昇させる可能性が示された。

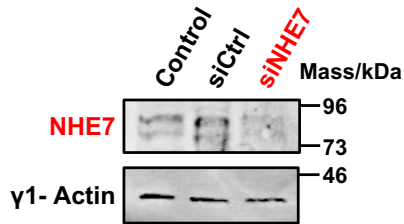
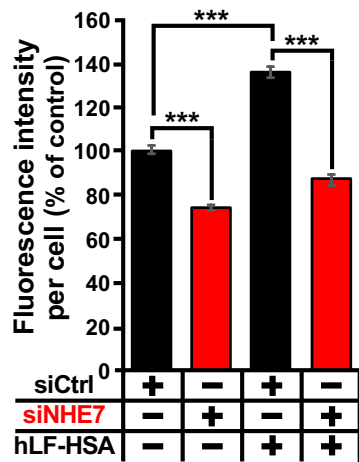
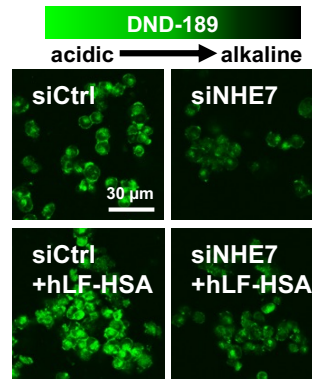
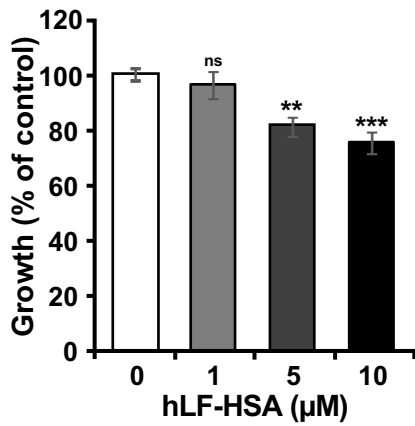
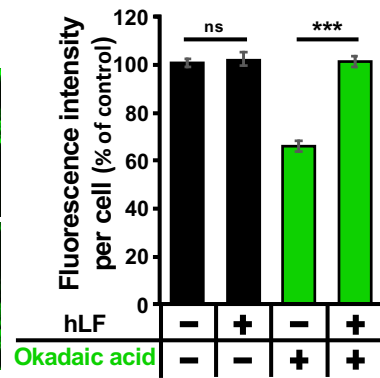
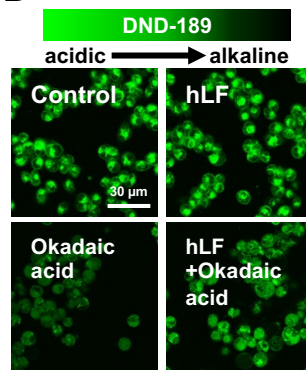
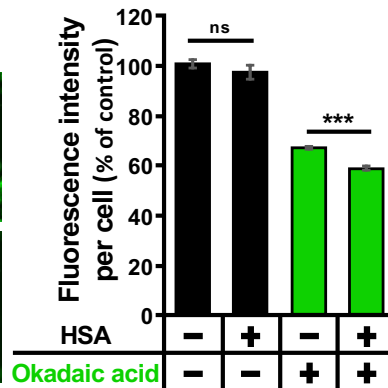
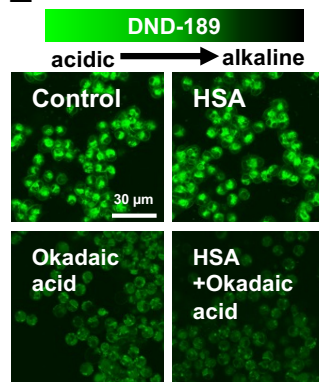
A**B****C****D****E**

Fig. 3-10. ヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 における細胞内小器官 pH に対する hLF-HSA 及び NHE7 ノックダウンの影響

(A) は、NHE7、 γ 1-Actin に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。 γ 1-Actin はローディングコントロールとして使用した。(B) は、NHE7 ノックダウン MIA PaCa-2 細胞における、5 μ M hLF-HSA の DND-189 を用いた細胞内 pH 試験の結果を示す。hLF-HSA は MIA PaCa-2 細胞に 4 時間処理した。細胞内 pH 試験の画像の右には、細胞の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均 \pm SD (n=50) で示した (***) p<0.001)。(C) は、1、5、10 μ M hLF-HSA を用いた細胞増殖試験の結果を示す。hLF-HSA は MIA PaCa-2 細胞に 72 時間処理した。値は平均 \pm SD (n=3) で示した (ns, not significant; ** p<0.01; *** p<0.001)。(D, E) は、1.25 μ M Okadaic acid 非存在下と存在下の 10 μ M hLF 又は 50 μ M HSA の DND-189 を用いた細胞内 pH 試験の結果を示す。hLF-HSA は MIA PaCa-2 細胞に 8 時間処理した。細胞内 pH 試験の画像の右には、細胞の蛍光強度を ImageJ で解析した結果を示す。値は平均 \pm SD (n=50) で示した (ns, not significant; *** p<0.001)。

第 4 節 結言

本章では、HSA 融合によって細胞内に送達された hLF がどのような機序で膵臓がん細胞 PC-9 の増殖を抑制しているのかを細胞内小器官 pH に着目して調べた。TGN は通常酸性であり、NHE7 はその pH 恒常性に関わっている。Fig. 3-11 で示すように、PC-9 細胞において、hLF は細胞内に取り込まれると、NHE7 の発現を上昇させることにより、細胞内小器官のアルカリ化を引き起こすことを見出した。PC-9 細胞における NHE7 の TGN での局在を考えると、細胞内小器官のアルカリ化は、主に TGN で起こると考えられる。TGN のアルカリ化はその機能阻害につながり、最終的に細胞増殖阻害をもたらすと結論した。

本章で得られた結果を表にまとめた (Table. 3-4)。NHE7 のノックダウンはヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 の増殖を阻害したが [5]、ヒト膵臓がん細胞株 PC-9 の増殖は阻害しなかった (Fig. 3-7C-1)。一方、hLF-HSA は、MIA PaCa-2 細胞 (Fig. 3-10C)

及び PC-9 細胞 (Fig. 3-7C) に対して増殖阻害活性を示した。したがって、hLF-HSA は H^+ の輸送方向が異なる両細胞株に対して有効であり、NHE7 の発現上昇は、汎用性の高いがん治療法として有用である可能性が示された。NHE7 発現増強因子としての hLF に関するこの最初の報告は、TGN の pH を標的とした抗がん治療に貢献する可能性がある。しかしながら、Table. 3-4 に示されるように hLF-HSA による NHE7 の発現上昇は、細胞内小器官と細胞質 pH に変化を及ぼすが、その変化は必ずしも裏表になっていなかった。また、肺がんや膵臓がんの間で、NHE7 の機能抑制は細胞質及び細胞内小器官 pH に対して異なった結果が得られた (Table. 3-4)。したがって、細胞内に送達された hLF は NHE7 以外の因子にも作用している可能性や細胞間で異なる pH 調整機能が存在する可能性が考えられる。今後は、様々な細胞株で検討することで、がん組織特異的な表現形であるのかを明らかにしたい。

第 1 章 3 節 5 項で述べたように、NHE7 が pH 制御する細胞内小器官である TGN は、細胞の遊走やメンブレントラフィッキングなど細胞の生存に不可欠である。NHE7 はがん細胞及び正常細胞においても機能していることから、TGN やゴルジ体 pH をターゲットとする研究は困難であると推察される。しかし、2020 年に Galenkamp らによって、正常ヒト膵臓細胞の NHE7 をノックダウンして、TGN の pH を変化を与えてもその増殖に影響を示さないことが報告された [5]。したがって、NHE7 は創薬ターゲットとして注目されている。hLF-HSA は、正常細胞に対して、増殖阻害活性を示さない [3]。加えて、hLF-HSA はがん細胞の増殖阻害だけでなくがんの遊走も阻害する [97]。これらのことから、hLF-HSA のがん細胞への選択性及びがんの遊走メカニズムに NHE7 による TGN の pH 制御が関わっている可能性

がある。今後は、hLF-HSA を NHE7 を解析するツールとして利用し、これらの可能性を追求していきたい。

Table. 3-4. NHE7 ノックダウン及び hLF-HSA 処理による細胞内小器官と細胞質 pH、細胞増殖への影響

がん細胞株	処理	細胞内小器官 pH	細胞質 pH	細胞増殖
PC-9	NHE7 KD	酸性化	変化なし	変化なし
	hLF-HSA	アルカリ化	酸性化	阻害
MIA PaCa-2	NHE7 KD	アルカリ化	酸性化	阻害 [5]
	hLF-HSA	酸性化	ND	阻害

略称: KD, Knockdown; ND, Not done

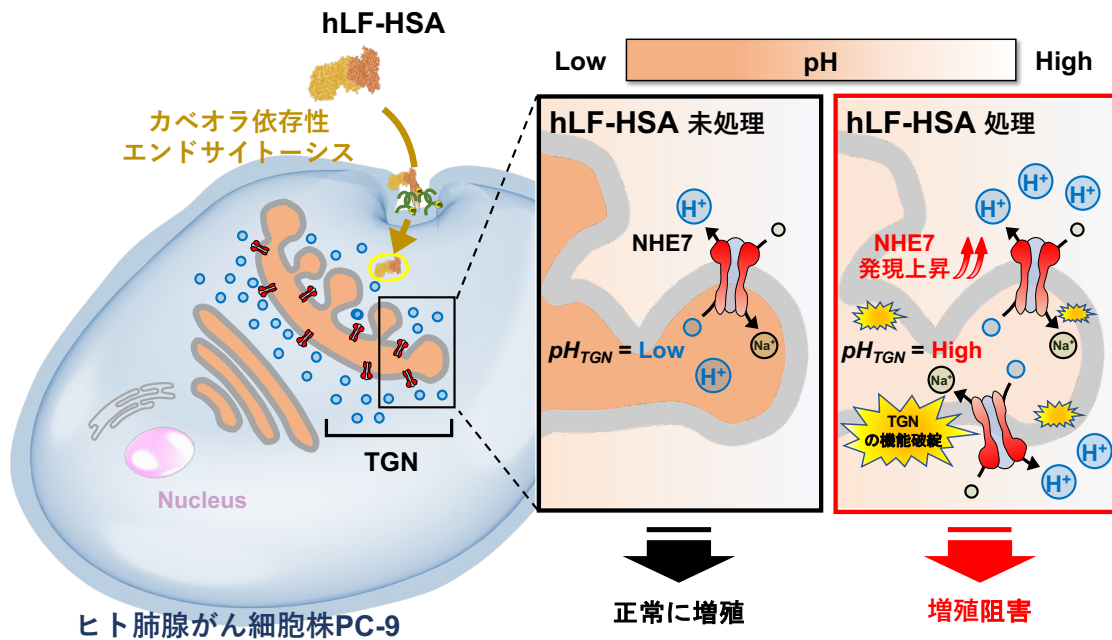


Fig. 3-11. hLF-HSA の抗腫瘍活性メカニズム

第4章 結論

当研究室で血中安定性の向上を目的に作製された hLF-HSA は、様々ながん細胞株に対して、高い増殖阻害活性を示した。本研究では、hLF-HSA の肺がん細胞に対する増殖阻害活性のメカニズムを明らかにするために、その細胞内取り込みに着目した。私は、hLF-HSA の肺がん細胞に対する細胞内取り込み及び増殖阻害メカニズムを明らかにした。以下、各章で得られた知見をまとめる。

第1章「緒論」では、各章での主要な分子や技術などに関する既知の知見について概説した。また、研究における現段階での課題を示した。さらに、各章における研究目的と意義について明確にした。

第2章「HSA 融合による hLF 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。

hLF は単独ではヒト肺腺がん細胞株 PC-14 の細胞内に取り込まれず、細胞表面に集積した。これは、hLF と細胞表面上の GAGs が結合していることに起因していることが示された。また、驚くことに HSA 単独もがん細胞内に対してカベオラ依存性エンドサイトーシスシグナルを誘導しにくく、細胞内に取り込まれにくいことも明らかにした。この要因としては、酸性タンパク質である HSA 単独は、細胞表

面上の負に帯電する GAGs との静電的反発により細胞表面に近接できず、HSA 受容体を介したカベオラ依存性エンドサイトーシスの活性化が困難であることが示された。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シグナル活性化が効率的に行われることが示された。

第 3 章「HSA 融合による hLF の TGN pH 制御」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。細胞内に送達された hLF が、TGN に発現する NHE7 の発現量を高めることで、TGN がアルカリ化され、がん細胞の増殖が抑制される機序を明らかにした。

PC-9 細胞に hLF 又は HSA 単独、あるいは同時に添加した場合、細胞内小器官の pH への影響はなかったが、hLF-HSA の場合はアルカリ化された。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 のアルカリ化効果は、基底の状態まで減弱されたことから、細胞内に送達されることがその活性発現に必要なことが確認された。カベオラ依存性エンドサイトーシスの活性剤で hLF を強制的に細胞内送達させると、細胞内小器官がアルカリ化された。また、我々が着目した主に TGN に発現する 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。さらに、hLF-HSA は PC-9 細胞の NHE7 の発現量を上昇させる可能性を見出した。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 の発現量を高めることで、TGN のアルカリ化を誘導し、細胞増殖を

抑制した可能性が示された。がん治療のターゲット分子として注目される NHE7 の発現上昇因子の報告は 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、PC-9細胞において、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 を発現抑制させるのではなく、発現上昇させ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。本研究での報告は、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。

本論文では、hLF-HSA の抗腫瘍活性を明らかにするために、その細胞内取り込みに着目した。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がより活性化され、細胞内に取り込まれるメカニズムを明らかにした。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、及び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 の生理機能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。

引用文献

1. Lee SH, Park SW, Pyo CW, Yoo NK, Kim J, Choi SY., Requirement of the JNK-associated Bcl-2 pathway for human lactoferrin-induced apoptosis in the Jurkat leukemia T cell line. *Biochimie*. 91 (1), 102-8 (2009).
2. Wolf JS, Li G, Varadhachary A, Petrak K, Schneyer M, Li D, Ongkasuwan J., Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Clin Cancer Res*. 13 (5), 1601-10 (2008).
3. Ueda K, Shimizu M, Ohashi A, Murata D, Suzuki T, Kobayashi N, Baba J, Takeuchi T, Shiga Y, Nakamura M, Kagaya S, Sato A., Albumin fusion at the N-terminus or C-terminus of human lactoferrin leads to improved pharmacokinetics and anti-proliferative effects on cancer cell lines. *Eur J Pharm. Sci*. 155, 105551 (2020).
4. Chatterjee M, Ben-Josef E, Robb R, Vedaie M, Seum S, Thirumoorthy K, Palanichamy K, Harbrecht M, Chakravarti A, Williams TM., Caveolae-Mediated Endocytosis Is Critical for Albumin Cellular Uptake and Response to Albumin-Bound Chemotherapy. *Cancer Res*. 77(21), 5925-5937 (2017).
5. Galenkamp KMO, Sosicka P, Jung M, Recouvreux MV, Zhang Y, Moldenhauer MR, Brandi G, Freeze HH, Commisso C., Golgi Acidification by NHE7 Regulates Cytosolic pH Homeostasis in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Discov*. 10, 822-835 (2020).
6. Alexander DB, Iigo M, Yamauchi K, Suzui M, Tsuda H., Lactoferrin: An alternative view of its role in human biological fluids. *Biochem. Cell Biol*. 90, 279-306 (2012).
7. Mattsby-Baltzer I, Roseanu A, Motas C, Elverfors J, Engberg I, Hanson LA., Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr Res*. 40(2), 257-62 (1996).
8. Van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK., Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res*. 52(3), 225-239 (2001).
9. Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M., Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta*. 1121(1-2), 130-6 (1992).
10. Sorensen M, Sorensen S., The Proteins in Whey. *Compte rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg Ser. Chim*. 23, 55-99 (1939).
11. Czosnykowska-Łukacka M, Orczyk-Pawilowicz M, Broers B, Królak-Olejnik B.,

- Lactoferrin in Human Milk of Prolonged Lactation. *Nutrients*. 11, 2350 (2019).
12. Baker EN, Baker HM, Kidd RD., Lactoferrin and transferrin: Functional variations on a common structural framework. *Biochem Cell Biol*. 80, 27-34 (2002).
 13. Baker EN, Lindley PF., New perspectives on the structure and function of transferrins. *J Inorg Biochem*. 47, 147-160 (1992).
 14. Anderson BF, Baker HM, Norris G, Rumball SV, Baker EN., Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins. *Nature*. 344, 784-787 (1990).
 15. Baker HM, Baker EN., A structural perspective on lactoferrin function. *Biochem Cell Biol*. 90, 320-328 (2012).
 16. Rosa L, Cutone A, Lepanto MS, Scotti MJ, Conte MP, Paesano R, Valenti P., Physico-chemical properties influence the functions and efficacy of commercial bovine lactoferrins. *Biometals*. 31, 301-312 (2018).
 17. Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M., Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol*. 73, 472-479 (1992).
 18. Van der Kraan MI, Groenink J, Nazmi K, Veerman EC, Bolscher JG, Nieuw Amerongen AV., Lactoferrampin: A novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*. 25, 177-183 (2004).
 19. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ., Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci*. 62, 2588-2598 (2005).
 20. Fernandes KE, Carter DA., The Antifungal Activity of Lactoferrin and Its Derived Peptides: Mechanisms Action and Synergy with Drugs against Fungal Pathogens. *Front Microbiol*. 18, 8-2 (2017).
 21. Berlutti F, Pantanella F, Natalizi T, Frioni A, Paesano R, Polimeni A, Valenti P., Antiviral properties of lactoferrin-a natural immunity molecule. *Molecules*. 16, 6992-7018 (2011).
 22. Drago-Serrano ME, Campos-Rodriguez R, Carrero JC, de la Garza M., Lactoferrin and Peptide-derivatives: Antimicrobial Agents with Potential Use in Nonspecific Immunity Modulation. *Curr Pharm Des*. 24, 1067-1078 (2018).

23. Arias M, Hilchie AL, Haney EF, Bolscher JG, Hyndman ME, Hancock RE, Vogel HJ., Anticancer activities of bovine and human lactoferricin-derived peptides. *Biochem Cell Biol.* 95, 91-98 (2017).
24. Damiens E, El Yazidi I, Mazurier J, Elass-Rochard E, Duthille I, Spik G., Boilly-Marer Y., Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Eur. J. Cell. Biol.* 77, 344-351 (1998).
25. Legrand D, van Berkel PH, Salmon V, van Veen HA, Slomianny MC, Nuijens JH, Spik G., The N-terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of human lactoferrin interact with sulphated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T-cells. *Biochem J.* 327, 841-846 (1997).
26. Kühnle A, Veelken R, Galuska CE, Saftenberger M, Verleih M, Schuppe HC, Rudloff S, Kunz C, Galuska SP., Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. *Carbohydr Polym.* 208, 32-41 (2019).
27. El Yazidi-Belkoura I, Legrand D, Nuijens J, Slomianny MC, van Berkel P, Spik G., The binding of lactoferrin to glycosaminoglycans on enterocyte-like HT29-18-C1 cells is mediated through basic residues located in the N-terminus. *Biochim Biophys Acta.* 1568, 197-204 (2001).
28. Riedl S, Leber R, Rinner B, Schaidler H, Lohner K, Zwegtück D., Human lactoferricin derived di-peptides displaying loop structures induce apoptosis specifically in cancer cells through targeting membranous phosphatidylserine. *Biochim. Biophys. Acta.* 1848, 2918-2931 (2015).
29. Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J, Furmanski P., Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.* 54, 2310-2312 (1994).
30. Furmanski P, Li ZP, Fortuna MB, Swamy CV, Das MR., Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity. *J Exp Med.* 170, 415-429 (1989).
31. Siebert PD, Huang BC., Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines. *Proc Nat. Acad Sci.* 94, 2198-2203 (1997).

32. Hoedt E, Hardivillé S, Mariller C, Ellass E, Perraudin JP, Pierce A., Discrimination and evaluation of lactoferrin and delta-lactoferrin gene expression levels in cancer cells and under inflammatory stimuli using TaqMan real-time PCR. *Biometals*. 23, 441-452 (2010).
33. Panella TJ, Liu YH, Huang AT, Teng CT., Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes, leukemic cells, and breast cancer. *Cancer Res*. 51, 3037-3043 (1991).
34. Teng C, Gladwell W, Raphiou I, Liu E., Methylation and expression of the gene in human tissues and cancer cells. *Biometals*. 17, 317-323 (2004).
35. Zhang J, Ling T, Wu H, Wang K., Re-expression of Lactotransferrin, a candidate tumor suppressor inactivated by promoter hypermethylation, impairs the malignance of oral squamous cell carcinoma cells. *J. Oral Pathol Med*. 44, 578-584 (2014).
36. Zhang Y, Lima CF, Rodrigues LR., Anticancer effects of lactoferrin: Underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. *Nutr Rev*. 72, 763-773 (2014).
37. Tsuda H, Kozu T, Iinuma G, Ohashi Y, Saito Y, Saito D, Akasu T, Alexander DB, Futakuchi M, Fukamachi K., Cancer prevention by bovine lactoferrin: From animal studies to human trial. *Biometals*. 23, 399-409 (2010).
38. Ushida Y, Sekine K, Kuhara T, Takasuka N, Iigo M, Maeda M, Tsuda H., Possible chemopreventive effects of bovine lactoferrin on esophagus and lung carcinogenesis in the rat. *Jpn J Cancer Res*. 90, 262-267 (1999).
39. Tanaka T, Kawabata K, Kohno H, Honjo S, Murakami M, Ota T, Tsuda H., Chemopreventive effect of bovine lactoferrin on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Jpn J Cancer Res*. 91, 25-33 (2000).
40. Sugihara Y, Zuo X, Takata T, Jin S, Miyauti M, Isikado A, Imanaka H, Tatsuka M, Qi G, Shimamoto F., Inhibition of DMH-DSS-induced colorectal cancer by liposomal bovine lactoferrin in rats. *Oncol Lett*. 14, 5688-5694 (2017).
41. Hegazy RR, Mansour DF, Salama AA, Abdel-Rahman RF, Hassan AM., Regulation of PKB/Akt-pathway in the chemopreventive effect of lactoferrin against diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Pharmacol Rep*. 71, 879-891 (2019).
42. Shimamura M, Yamamoto Y, Ashino H, Oikawa T, Hazato T, Tsuda H, Iigo M., Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*. 111, 111-116 (2004).

43. Gibbons JA, Kanwar RK, Kanwar JR., Lactoferrin and cancer in different cancer models. *Front Biosci.* 3, 1080-1088 (2011).
44. Varadhachary A, Wolf JS, Petrak K, O'Malley BW, Spadaro M, Curcio C, Forni G, Pericle F., Oral lactoferrin inhibits growth of established tumors and potentiates conventional chemotherapy. *Int J Cancer.* 111, 398-403 (2004).
45. Sun X, Jiang R, Przepiorski A, Reddy S, Palmano KP, Krissansen GW., "Iron-saturated" bovine lactoferrin improves the chemotherapeutic effects of tamoxifen in the treatment of basal-like breast cancer in mice. *BMC Cancer.* 12, 591 (2012).
46. Kozu T, Iinuma G, Ohashi Y, Saito Y, Akasu T, Saito D, Alexander DB, Iigo M, Kakizoe T, Tsuda H., Effect of Orally Administered Bovine Lactoferrin on the Growth of Adenomatous Colorectal Polyps in a Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Cancer Prev. Res.* 2, 975-983 (2009).
47. Iigo M, Alexander DB, Xu J, Futakuchi M, Suzui M, Kozu T, Akasu T, Saito D, Kakizoe T, Yamauchi K., Inhibition of intestinal polyp growth by oral ingestion of bovine lactoferrin and immune cells in the large intestine. *Biometals.* 27, 1017-1029 (2014).
48. Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells
49. Apo- and holo-lactoferrin stimulate proliferation of mouse crypt cells but through different cellular signaling pathways
50. A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells.
51. Duarte DC, Nicolau A, Teixeira JA, Rodrigues LR., The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines. *J Dairy Sci.* 94, 66-76 (2011).
52. Jiang R, Lönnerdal B., Bovine lactoferrin and lactoferricin exert antitumor activities on human colorectal cancer cells (HT-29) by activating various signaling pathways. *Biochem Cell Biol.* 95, 99-109 (2017).
53. Vargas Casanova Y, Rodríguez Guerra JA, Umaña Pérez YA, Leal Castro AL, Almanzar Reina G, García Castañeda J.E, Rivera Monroy ZJ., Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Molecules.* 22, 1641 (2017).

54. Sharma A, Shandilya UK, Sodhi M, Mohanty AK, Jain P, Mukesh M., Evaluation of Milk Colostrum Derived Lactoferrin of Sahiwal (*Bos indicus*) and Karan Fries (Cross-Bred) Cows for Its Anti-Cancerous Potential. *Int J Mol Sci.* 20, 6318 (2019).
55. Xiao Y, Monitto CL, Minhas KM, Sidransky D, Lactoferrin down-regulates G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of head and neck cancer cells. *Clin Cancer Res.* 10 (24), 8683-6 (2004).
56. Chanbora Chea, Mutsumi Miyauchi, Toshihiro Inubushi, Nurina Febriyanti Ayuningtyas, Ajiravudh Subarnbhesaj,Phuong Thao Nguyen, Madhu Shrestha, Sivmeng Haing, Kouji Ohta, Takashi Takata. Molecular mechanism of inhibitory effects of bovine lactoferrin on the growth of oral squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 13(1), e0191683 (2018)
57. Damiens E, El Yazidi I, Mazurier J, Duthille I, Spik G, Boilly-Marer Y., Lactoferrin Inhibits G1 Cyclin-Dependent Kinases During Growth Arrest of Human Breast Carcinoma. *Cells Cell Biochem.* 74 (3), 486-98 (1999).
58. H.Y.Li, P.Li, H.G.Yang, Y.Z.Wang, G.X.Huang, J.Q.Wang, N.Zheng. Investigation and comparison of the anti-tumor activities of lactoferrin, α -lactalbumin, and β -lactoglobulin in A549, HT29, HepG2, and MDA231-LM2 tumor models. *J Dairy Sci.* 102(11), 9586-9597 (2019)
59. Shin-Hee Lee, Hye-Min Hwang, Chul-Woong Pyo, Dae Hyun Hahm, Sang-Yun Choi. E2F1-directed activation of Bcl-2 is correlated with lactoferrin-induced apoptosis in Jurkat leukemia T lymphocytes. *Biometals.* 23(3), 507-14 (2010)
60. Jiang R , Lopez V , Kelleher SL , Lönnerdal B., Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells. *J Cell Physiol.* 226 (11), 3022-31 (2011).
61. Akiyama Y, Oshima K, Kuhara T, Shin K, Abe F, Iwatsuki K, Nadano D, Matsuda T., A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Biochem.* 154 (5), 437-48 (2013).
62. Grey A, Banovic T, Zhu Q, Watson M, Callon K, Palmano K, Ross J, Naot D, Reid IR, Cornish J., The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for

- lactoferrin in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol.* 18 (9), 2268-78 (2004).
63. Florian P, Macovei A, Sima L, Nichita N, Mattsby-Baltzer I, Roseanu A., Endocytosis and trafficking of human lactoferrin in macrophage-like human THP-1 cells *Biochem. Cell Biol.* 90, 449-455 (2012).
 64. Dalton CM, Schlegel C, Hunter CJ., Caveolin-1: A Review of Intracellular Functions, Tissue-Specific Roles, and Epithelial Tight Junction Regulation. *Biology (Basel).* 12 (11), 1402(2023).
 65. Tiruppathi C, Song W, Bergenfeldt M, Sass P, Malik AB., Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 272(41), 25968-25975 (1997).
 66. Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC, Anderson CL., The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med.* 197 (3), 315-22 (2003).
 67. Li R, Zheng K, Hu P, Chen Z, Zhou S, Chen J, Yuan C, Chen S, Zheng W, Ma E, Zhang F, Xue J, Chen X, Huang M., A novel tumor targeting drug carrier for optical imaging and therapy. *Theranostics.* 4 (6), 642-59 (2014).
 68. Wang S, Liu S, Zhang Y, He J, Coy DH, Sun L., Human Serum Albumin (HSA) and Its Applications as a Drug Delivery Vehicle. *Health Science Journal* (2020).
 69. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, et al., Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol.* 23 (31), 7794-7803 (2005).
 70. Chia J, Louber J, Glauser I, Taylor S, Bass GT, Dower SK, Gleeson PA, Verhagen AM, Half-life– extended recombinant coagulation factor IX–albumin fusion protein is recycled via the FcRn-mediated pathway. *J Biol Chem.* 293 (17), 6363-6373 (2018).
 71. Swiercz R, Mo M, Khare P, Schneider Z, Ober RJ, Ward ES., Loss of expression of the recycling receptor, FcRn, promotes tumor cell growth by increasing albumin consumption. *Oncol.* 8, 3528-3541 (2016).
 72. Cadena Castaneda D, Brachet G, Goupille C, Ouldamer L, Gouilleux-Gruart V., The neonatal Fc receptor in cancer FcRn in cancer. *Cancer Med.* 9(13), 4736-4742 (2020).
 73. Rudnik-Jansen I, Howard KA., FcRn expression in cancer: Mechanistic basis and

- therapeutic opportunities. *J Control Release*. 337, 248-257 (2021)
74. P. Chavrier, R.G. Parton, H.P. Hauri, K. Simons, M. Zerial, Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*. 62, 317-329 (1990).
 75. J.P. Gorvel, P. Chavrier, M. Zerial, J. Gruenberg, rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*. 64, 915-925 (1991).
 76. O. Ullrich, S. Reinsch, S. Urbé, M. Zerial, R.G. Parton, Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* 135, 913-924 (1996).
 77. Takakura Y. Takahashi Y., Strategies for persistent retention of macromolecules and nanoparticles in the blood circulation. *J Control Release*. 350, 486-493. (2020).
 78. Gradishar WJ., Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother.* 7 (8), 1041-53 (2006).
 79. Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, Parker SJ, Kamphorst JJ, Hackett S, Grabocka E, Nofal M, Drebin JA, Thompson CB, Rabinowitz JD, Metallo CM, Vander Heiden MG, Bar-Sagi D., Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*. 497 (7451), 633-7 (2013).
 80. Prior, I.A., Hood, F.E., Hartley, J.L., The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res.* 80, 2969-2974 (2020).
 81. Xu XD, Shao SX, Jiang HP, Cao YW, Wang YH, Yang XC, Wang YL, Wang XS, Niu HT., Warburg effect or reverse Warburg effect? A review of cancer metabolism. *Oncol Res Treat.* 38 (3), 117-22 (2015).
 82. Liberti MV, Locasale JW., The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 41 (3), 211-218 (2016).
 83. Sung S, Choi J, Cheong H., Catabolic pathways regulated by mTORC1 are pivotal for survival and growth of cancer cells expressing mutant Ras. *Oncotarget.* 6 (38), 40405-40417 (2015).
 84. Prior, I.A., Hood, F.E., Hartley, J.L., 2020. The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res* 80, 2969–2974.
 85. Schnitzer JE, Oh P., Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J*

- Biol Chem.* 269 (8), 6072-82 (1994).
86. Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisanti MP., Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem.* 276, 48619-48622 (2001).
 87. Spada, A., Emami, J., Tuszynski, J.A., Lavasanifar, A., The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery. *Mol. Pharm.* 18, 1862-1894 (2021).
 88. Cho, H., Jeon, S.I., Ahn, C.H., Shim, M.K., Kim, K., Emerging Albumin-Binding Anticancer Drugs for Tumor-Targeted Drug Delivery: Current Understandings and Clinical Translation. *Pharmaceutics.* 14, (2022).
 89. Wagner AJ, Ravi V, Riedel RF, Ganjoo K, Van Tine BA, Chugh R, Cranmer L, Gordon EM, Hornick JL, Du H, Grigorian B, Schmid AN, Hou S, Harris K, Harris K, Kwiatkowski DJ, Desai NP, Dickson MA., nab-Sirolimus for Patients With Malignant Perivascular Epithelioid Cell Tumors. *J Clin Oncol.* 39 (33), 3660-3670 (2021).
 90. Shen, X., Liu, X., Li, T., Chen, Y., Chen, Y., Wang, P., Zheng, L., Yang, H., Wu, C., Deng, S., Liu, Y., Recent Advancements in Serum Albumin-Based Nanovehicles Toward Potential Cancer Diagnosis and Therapy. *Front Chem.* 9, 746646 (2021).
 91. Nolte MW, Nichols TC, Mueller-Cohrs J, Merricks EP, Pragst I, Zollner S, Dickneite G., Improved kinetics of rIX-FP, a recombinant fusion protein linking factor IX with albumin, in cynomolgus monkey and hemophilia B dogs. *J Thromb Haemost.* 10, 1591-9 (2012).
 92. Zhao J, Si Y, Cheng M, Yang Y, Niu Y, Li X, Liu X, Yang W., Albumin fusion of interleukin-28B: production and characterization of its biological activities and protein stability. *PLoS One.* 8 (5) (2013).
 93. Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Chuang VT, Ishima Y, Hamasaki K, Tanaka K, Mizushima T, Otagiri M, Maruyama T., Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J Pharmacol Exp Ther.* 345, 271-83 (2013).
 94. Zhao S, Zhang Y, Tian H, Chen X, Cai D, Yao W, Gao X., Extending the serum half-life of G-CSF via fusion with the domain III of human serum albumin. *BioMed Res Int.* (2013).
 95. Berger V, Richter F, Zettlitz K, Unverdorben Felix, Scheurich P, Herrmann A, Pfizenmaier K, Kontermann RE., An anti-TNFR1 scFv-HSA fusion protein as selective antagonist of

- TNF action. *Protein Eng Des Sel.* 26, 581-587 (2013).
96. Nicolì E, Syga MI, Bosetti M, Shastri VP., Enhanced gene silencing through human serum albumin-mediated delivery of polyethyleneimine-siRNA polyplexes. *PLoS One.* 10 (2015).
 97. Nopia H, Kurimoto D, Sato A, Albumin fusion with human lactoferrin shows enhanced inhibition of cancer cell migration, *BioMetals*, 36, 629-638 (2023).
 98. Amith SR, Fliegel L., Regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) in breast cancer metastasis. *Cancer Research.* 73 (4), 1259-1264 (2013).
 99. Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K., Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res*, 66 (13), 6699-6707 (2006).
 100. Kato Y, Nakayama Y, Umeda M, Miyazaki K. Induction of a 103-kDa gelatinase/type IV collagenase by acidic culture conditions in mouse metastatic melanoma cell lines. *J Biol Chem.* 267, 11424-30 (1992).
 101. Pedersen SF, Counillon L., The SLC9A-C mammalian Na⁺/H⁺ exchanger family: molecules, mechanisms, and physiology. *Physiological Reviews*, 99 (4), 2015-2113 (2019).
 102. Brett CL, Donowitz M, Rao R., Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288 (2), C223-C239 (2005).
 103. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL., Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 11 (9), 671-677 (2011).
 104. Hu YB., Dammer EB, Ren RJ, Wang G., The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener.* 4, 18 (2015).
 105. Ponnambalam S, Baldwin SA., Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Mol Membr Biol.*, 20 (2), 129-39 (2003).
 106. Gandhi SP, Stevens CF., Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature.* 423 (6940), 607-613 (2003).
 107. Ponnambalam S, Baldwin SA., Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Mol Membr Biol.*, 20 (2), 129-39 (2003).
 108. Pamarthy S, Kulshrestha A, Katara GK, Beaman KD., The curious case of vacuolar ATPase: regulation of signaling pathways. *Molecular Cancer.* 17 (1), 41 (2018).
 109. Whitton B, Okamoto H, Packham G, Crabb SJ., Vacuolar ATPase as a potential therapeutic

- target and mediator of treatment resistance in cancer. *Cancer Medicine*. 7 (8), 3800-3811 (2018).
110. Brett CL, Donowitz M, Rao R., Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol*. 288, C223-C239 (2005).
 111. Ohgaki R, Matsushita M, Kanazawa H, Ogihara S, Hoekstra D, van Ijzendoorn SC. The Na⁺/H⁺ exchanger NHE6 in the endosomal recycling system is involved in the development of apical bile canalicular surface domains in HepG2 cells. *Mol Biol Cell*. 21, 1293-1304 (2010).
 112. Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K, Kanazawa H. Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J Biol Chem*. 280, 1561-1572 (2005).
 113. Orłowski J, Grinstein S., Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch*. 447(5), 549-565 (2004).
 114. Donowitz M, Cha B, Zachos NC, Brett CL, Sharma A, Tse CM, Li X., NHERF family and NHE3 regulation. *J Physiol*. 567(Pt 1), 3-11 (2005).
 115. Slepko ER, Rainey JK, Sykes BD, Fliegel L., Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem J*. 401(3):623-33 (2007).
 116. D'Souza S, Garcia-Cabado A, Yu F, Teter K, Lukacs G, Skorecki K, Moore HP, Orłowski J, Grinstein S., The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na⁺/H⁺ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. *J Biol Chem*. 273 (4), 2035-2043 (1998).
 117. Ko M, Quiñones-Hinojosa A, Rao R., The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na⁺/H⁺ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. *Cancer Metastasis Rev*. 39 (2), 519-534 (2020).
 118. Gekle M, Drumm K, Mildenerger S, Freudinger R, Gassner B, Silbernagl S., Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange impairs receptor-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule-derived epithelial cells from opossum. *The Journal of Physiology*. 520 (Pt 3), 709-721 (1999).
 119. Lee C, Kang HJ, von Ballmoos C, Newstead S, Uzdavinyas P, Dotson DL, Iwata S, Beckstein O, Cameron AD, Drew D., A two-domain elevator mechanism for sodium/ proton antiport. *Nature*. 501 (7468), 573-577 (2013)

120. Takatani-Nakase T, Matsui C, Hosotani M, Omura M, Takahashi K, Nakase I, Hypoxia enhances motility and EMT through the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 in MDA-MB-231 breast cancer cells, Pathophysiology of hepatic Na⁺/H⁺ exchange. *Exp Cell Res.* 412 (1), 113006 (2022).
121. Numata M, Orlowski J., Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network. *J Biol Chem.* 276 (20), 17387-94 (2011).
122. Meda SA, Narayanan B, Liu J, Perrone-Bizzozero NI, Stevens MC, Calhoun VD, Glahn DC, Shen L, Risacher SL, Saykin AJ, Pearlson GD., A large scale multivariate parallel ICA method reveals novel imaging-genetic relationships for Alzheimer's disease in the ADNI cohort. *Neuroimage.* 60 (3), 1608-21 (2012).
123. Zhang L, Wang T, Wright A.F, Suri M, Schwartz C.E, Stevenson R.E, Valle D., A microdeletion in Xp11.3 accounts for co-segregation of retinitis pigmentosa and mental retardation in a large kindred. *Am. J. Med. Genet. A.* 140, 349-357 (2006).
124. Kagami T, Chen S, Memar P, Choi M, Foster LJ, Numata M., Identification and biochemical characterization of the SLC9A7 interactome. *Mol Membr Biol.* 25 (5), 437-447 (2008).
125. Onishi I, Lin PJ, Numata Y, Austin P, Cipollone J, Roberge M, Roskelley CD, Numata M., Organellar (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchanger NHE7 regulates cell adhesion, invasion and anchorage-independent growth of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Oncol Rep.* 27 (2), 311-7 (2012).
126. Milosavljevic N, Monet M, Léna I, Brau F, Lacas-Gervais S, Feliciangeli S, Counillon L, Poët M., The Intracellular Na⁺/H⁺ Exchanger NHE7 Effects a Na⁺-Coupled, but Not K⁺-Coupled Proton-Loading Mechanism in Endocytosis. *Cell Rep.* 7 (3), 689-96 (2014).
127. Mellman I, Warren G., The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell.* 100 (1), 99-112 (2000).
128. Nilsson T, Au CE, Bergeron JJ., Sorting out glycosylation enzymes in the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* 583 (23), 3764-9 (2009).
129. Mellman I, Warren G., The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell.* 100 (1), 99-112 (2000).
130. Numata M, Orlowski J., Molecular Cloning and Characterization of a Novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ Exchanger Localized to the trans-Golgi Network. *Biol Chem.* 276 (20), 17387-94 (2001).
131. Anderson RG, Pathak RK., Vesicles and cisternae in the trans golgi apparatus of human

- fibroblasts are acidic compartments. *Cell*. 40 (3), 635-43 (1985).
132. Mellman I., The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J Exp Biol*. 172, 39-45 (1992).
 133. Klumperman J., Architecture of the Mammalian Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3 (7), a005181 (2011)
 134. Noro R, Gemma A, Kosaihiro S, Kokubo Y, Chen M, Seike M, Kataoka K, Matsuda K, Okano T, Minegishi Y, Yoshimura A, Kudoh S., Gefitinib (IRESSA) sensitive lung cancer cell lines show phosphorylation of Akt without ligand stimulation. *BMC Cancer*. 6, 277 (2006).
 135. Kiss AL, Botos E., Ocadaic acid retains caveolae in multicaveolar clusters. *Pathol Oncol Res*. 15, 479-486 (2009).
 136. Sharma, D.K., Brown, J.C., Choudhury, A., Peterson, T.E., Holicky, E., Marks, D.L., Simari, R., Parton, R.G., Pagano, R.E., Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol Biol Cell*. 15, 3114-3122 (2004).
 137. Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, et al., Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res*. 4 (8), 1873-80 (1998).
 138. Pinilla SM, Honrado E, Hardisson D, Benitez J, Palacios J., Caveolin-1 expression is associated with a basal-like phenotype in sporadic and hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 99 (1), 85-90 (2006).
 139. Ho CC, Kuo SH, Huang PH, Huang HY, Yang CH, Yang PC., Caveolin-1 expression is significantly associated with drug resistance and poor prognosis in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine-based chemotherapy. *Lung Cancer*. 59(1), 105-110 (2008).
 140. Huang C, Qiu Z, Wang L, Peng Z, Jia Z, Logsdon CD., A novel FoxM1- caveolin signaling pathway promotes pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res*. 72 (3), 655-65 (2012).
 141. Zhan P, Shen XK, Qian Q, Wang Q, Zhu JP, Zhang Y, et al. Expression of caveolin-1 is correlated with disease stage and survival in lung adenocarcinomas. *Oncol Rep*. 27 (4), 1072-1078 (2012).

142. Williams TM, Lisanti MP., Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288(3), C494-506 (2005).
143. Chanvorachote P, Pongrakhananon V, Halim H., Caveolin-1 regulates metastatic behaviors of anoikis resistant lung cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 399 (1-2), 291-302 (2015).
144. Liu Y, Fu Y, Hu X, Chen S, Miao J, Wang Y, et al., Caveolin-1 knockdown increases the therapeutic sensitivity of lung cancer to cisplatin-induced apoptosis. *J Cell Physiol.* 235 (2), 1197-1208 (2020).
145. Chatterjee M, Ben-Josef E, Thomas DG, Morgan MA, ZalupskiMM, Khan G, et al., Caveolin-1 is associated with tumor progression and confers a multimodality resistance phenotype in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 5, 10867 (2015).
146. Nakamura, M., Sato, A., Glycan-binding properties of basic whey protein lactoferrin and its application in nerve regenerative medicine. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology.* 34, E1-E5 (2022).
147. Schnitzer JE, Oh P., Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J Biol Chem.* 269, 6072-6082 (1994).
148. Ji ZS, Mahley RW., Lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans and the LDL receptor-related protein. Further evidence supporting the importance of direct binding of remnant lipoproteins to HSPG. *Arterioscler Thromb.* 14, 2025-2031 (1994).
149. Wally, J., Buchanan, S.K., 2007. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. *BioMetals.* 20, 249-262 (2007).
150. Noro R, Gemma A, Kosaihira S, Kokubo Y, Chen M, Seike M, Kataoka K, Matsuda K, Okano T, Minegishi Y, Yoshimura A, Kudoh S., Gefitinib (IRESSA) sensitive lung cancer cell lines show phosphorylation of Akt without ligand stimulation. *BMC Cancer.* 6, 277 (2006).
151. Weiss RJ, Esko JD, Tor Y., Targeting heparin and heparan sulfate protein interactions. *Org Biomol Chem.* 15, 5656-5668 (2017).
152. Abbasi S, Paul A, Shao W, Prakash S, Cationic albumin nanoparticles for enhanced drug delivery to treat breast cancer: preparation and in vitro assessment. *J Drug Deliv.* 686108 (2012).

153. Lin HJ, Herman P, Kang JS, Lakowicz JR, Fluorescence lifetime characterization of novel low-pH probes. *Anal Biochem.* 294, 118-125 (2001).
154. Thomas JA., Intracellularly trapped pH indicators. *Soc Gen Physiol Ser.* 40, 311-325 (1986).
155. López-Hernández T, Puchkov D, Krause E, Maritzen T, Haucke V., Endocytic regulation of cellular ion homeostasis controls lysosome biogenesis. *Nat. Cell Biol.* 22, 815-827 (2020).
156. Martins JP, Kennedy PJ, Santos HA, Barrias C, Sarmiento B., A comprehensive review of the neonatal Fc receptor and its application in drug delivery. *Pharmacol. Ther.* 161, 22-39 (2016).
157. Luzio JP, Brake B, Banting G, Howell KE, Braghetta P, Stanley KK., Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN38). *Biochem J.* 270, 97-102 (1990).
158. Lin PJ, Williams WP, Luu Y, Molday RS, Orłowski J, Numata M., Secretory carrier membrane proteins interact and regulate trafficking of the organellar (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchanger NHE7 Lin PJ. *J Cell Sci.* 118 (Pt 9), 1885-1897(2005).

著者目録

第 2 章を構成する論文

1. 2023 年 9 月 European Journal of Pharmaceutical Sciences

Daisuke Kurimoto and Atsushi Sato

Enhanced intracellular uptake of an albumin fusion protein in cancer cells by its forced cell surface recruitment

第 3 章を構成する論文

2. 2024 年 1 月 Biochemical and Biophysical Research Communications

Daisuke Kurimoto, Truong Dinh Hue Anh, Ryoya Kasama and Atsushi Sato

Intracellularly delivered human lactoferrin functions as an activator of Na⁺/H⁺ exchanger 7

研究実績

A) 論文

1. 2022年9月 Biometals
Hana Nopia, Daisuke Kurimoto and Atsushi Sato
Albumin fusion with human lactoferrin shows enhanced inhibition of cancer cell migration

B) プロシーディング

1. 2019年4月 ラクトフェリン 2018
栗本 大輔, 笠間 諒也, 高橋 睦実, 中村 真男, 佐藤 淳
ヒトラクトフェリン-ヒト血清アルブミン融合タンパク質の抗腫瘍増強
2. 2023年4月 ラクトフェリン 2022
栗本 大輔, トルンディン ハウエーアン, 吉川 美佳, 佐藤 淳
アルブミン融合によるラクトフェリン新規細胞内送達システムの開発—細胞内送達によるラクトフェリンの新たな機能の発見—
3. 2023年4月 ラクトフェリン 2022
Hana Nopia, Daisuke Kurimoto, Atsushi Sato
Albumin Fusion with Human Lactoferrin shows enhanced inhibition of cancer cell migration
4. 2023年4月 ラクトフェリン 2022
トルンディン ハウエーアン, 栗本 大輔, 笠間 諒也, 佐藤 淳
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—細胞内小器官 pH への影響—

5. 2023年4月 ラクトフェリン 2022

吉川 美佳, トルンディン ハウエーアン, 栗本 大輔, 佐藤 淳

ヒト血清アルブミン融合ヒトラクトフェリンの増強した抗腫瘍メカニズム

C) 国内学会での発表

1. 2018年9月 第62回日本薬学会関東支部大会 (ポスター発表)

栗本 大輔, 笠間 諒也, 高橋 睦実, 中村 真男, 佐藤 淳

ヒトラクトフェリン-ヒト血清アルブミン融合タンパク質の抗腫瘍増強—細胞内
取り込みによる可能性—

2. 2018年9月 第62回日本薬学会関東支部大会 (口頭発表)

高橋 睦実, 栗本 大輔, 笠間 諒也, 中村 真男, 佐藤 淳

アルブミン融合によるヒトラクトフェリンのがん細胞への毒性増強：オートフ
アジー活性化による可能性

3. 2018年9月 第62回日本薬学会関東支部大会 (口頭発表)

笠間 諒也, 栗本 大輔, 高橋 睦実, 中村 真男, 佐藤 淳

ヒトラクトフェリン-ヒト血清アルブミン融合タンパク質がん細胞に対する細胞
毒性増強

4. 2018年10月 日本ラクトフェリン学会第8回学術集会 (口頭発表)

栗本 大輔, 笠間 諒也, 高橋 睦実, 中村 真男, 佐藤 淳

ヒト血清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

5. 2019年3月 日本薬学会第139年会 (ポスター発表)

笠間 諒也, 栗本 大輔, 高橋 睦実, 中村 真男, 佐藤 淳

ヒトラクトフェリンへのヒト血清アルブミン融合によるガン細胞毒性増強メカニ
ズム

6. 2019年6月 2019年度日本生化学会関東支部例会 (口頭発表及びポスター発表)
栗本 大輔, 笠間 諒也, 中村 真男, 佐藤 淳
ヒト血清アルブミン融合による抗腫瘍活性を増強するヒトラクトフェリンの細胞内取り込み促進: カベオラ介在性エンドサイトーシスによる制御
7. 2019年6月 2019年度日本生化学会関東支部例会 (ポスター発表)
笠間 諒也, 栗本 大輔, 中村 真男, 佐藤 淳
ヒトラクトフェリンへのヒト血清アルブミン融合によるマクロピノサイトーシスが関与する細胞毒性増強メカニズム
8. 2020年8月 第36回日本DDS学会学術集会 (ポスター発表)
栗本 大輔, 中村 真男, 佐藤 淳
アルブミン癒合によるヒトラクトフェリンの抗腫瘍活性増強にはその電荷が重要な働きをする
9. 2021年9月 第65回日本薬学会関東支部大会 (口頭発表)
栗本 大輔, 笠間 諒也, トルンディン ハウエーアン, 佐藤 淳
ヒト血清アルブミン融合ヒトラクトフェリンの増強した抗腫瘍活性には、カベオラ依存的な細胞内取り込みが関与する
10. 2021年9月 第65回日本薬学会関東支部大会 (口頭発表)
鈴木 栞, 栗本 大輔, 佐藤 淳
ヒトラクトフェリンのガン細胞内強制発現はその増殖を阻害する
11. 2021年9月 第65回日本薬学会関東支部大会 (口頭発表)
渡部 文周, 高瀬 穰, ハナ ノピア, 栗本 大輔, 佐藤 淳
ヒト血清アルブミン融合ヒトラクトフェリンのガン細胞増殖阻害に対する胎児性Fc受容体 (FcRn)の影響

12. 2021 年 9 月 第 65 回日本薬学会関東支部大会 (ポスター発表)
吉川 美佳, 栗本 大輔, 笠間 諒也, 佐藤 淳
ヒト血清アルブミン融合ヒトラクトフェリンのがん細胞に対する細胞毒性
13. 2021 年 9 月 第 65 回日本薬学会関東支部大会 (ポスター発表)
トルンディン ハウエーアン, 栗本 大輔, 笠間 諒也, 佐藤 淳
ヒト血清アルブミン融合ヒトラクトフェリン (hLF-HSA)のヒト肺腺ガン PC-9 細胞における取り込みと増殖阻害
14. 2022 年 10 月 日本ラクトフェリン学会第 10 回学術集会
(シンポジウム及びポスター発表)
栗本 大輔, トルンディン ハウエーアン, 吉川 美佳, 佐藤 淳
アルブミン融合によるラクトフェリン新規細胞内送達システムの開発—細胞内送達によるラクトフェリンの新たな機能の発見—
津田賞を受賞
15. 2022 年 10 月 日本ラクトフェリン学会第 10 回学術集会 (ポスター発表)
Hana Nopia, Daisuke Kurimoto, Atsushi Sato
Albumin Fusion with Human Lactoferrin shows enhanced inhibition of cancer cell migration
16. 2022 年 10 月 日本ラクトフェリン学会第 10 回学術集会 (ポスター発表)
トルンディン ハウエーアン, 栗本 大輔, 笠間 諒也, 佐藤 淳
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—細胞内小器官 pH への影響—
17. 2022 年 10 月 日本ラクトフェリン学会第 10 回学術集会 (ポスター発表)
吉川 美佳, トルンディン ハウエーアン, 栗本 大輔, 佐藤 淳
ヒト血清アルブミン融合ヒトラクトフェリンの増強した抗腫瘍メカニズム

18. 2023 年 6 月 2023 年度 日本生化学会関東支部例会 (口頭発表)

トルンディン ハウエーアン, 栗本 大輔, 佐藤 淳

アルブミン融合によるヒラクトフェリンの抗腫瘍活性増強—細胞内送達による細胞内小器官 pH の上昇—

優秀発表賞を受賞

19. 2023 年 9 月 第 67 回日本薬学会関東支部大会 (口頭発表)

栗本 大輔, トルンディン ハウエーアン, 佐藤 淳

アルブミン融合ヒラクトフェリンの新たな抗ガン作用 —Na⁺/H⁺交換体 7 活性化による細胞内小器官 pH の上昇—

20. 2023 年 9 月 第 67 回日本薬学会関東支部大会 (口頭発表)

川俣 大空, 栗本 大輔, 木村 将大, 佐藤 淳

アルブミン融合ヒラクトフェリンを発現する CHO 細胞用無血清培地

21. 2023 年 9 月 第 67 回日本薬学会関東支部大会 (ポスター発表)

Hana Nopia, Daisuke Kurimoto, Masahiro Kimura, Atsushi Sato

Albumin fusion to human lactoferrin enhances its anti-EMT effects on human lung adenocarcinoma PC-14 cells

D) 国際会議での発表

1. 2021 年 12 月 15th International Conference on Lactoferrin Structure, Function, and Applications (Oral presentation)

Daisuke Kurimoto, Mika Yoshikawa, Shiori Suzuki, Atsushi Sato

“Lactoferrin-Meets-Albumin” shows enhanced intracellular delivery

Youth Scientist Award を受賞

2. 2021年12月 15th International Conference on Lactoferrin Structure, Function, and Applications (Oral presentation)

Hana Nopia, Daisuke Kurimoto, Atsushi Sato

Albumin fusion with human lactoferrin displays enhanced inhibition of cancer cell migration

E) その他

1. 2018年11月 サイエンスアゴラ 2018 (展示会)

中村 真男, 松崎 巧実, 飯森 愛美, 栗本 大輔

"甘くない糖"の科学で拓くニッポン健康社会

2. 2019年11月 サイエンスアゴラ 2019 (展示会)

中村 真男, 飯森 愛美, 栗本 大輔

長寿活躍社会を拓く“グライコ”ヘルスケア

3. 2022年5月 ifia/HFE JAPAN 国際食品素材/添加物展・会議 2022 第27回 (講演)

栗本 大輔

ラクトフェリンへのアルブミン融合は、ラクトフェリンの細胞内取り込みを促進し、その機能を高める

4. 2023年5月 ifia/HFE JAPAN 国際食品素材/添加物展・会議 2023 第28回 (講演)

栗本 大輔

アルブミン融合によるラクトフェリン新規細胞内送達システムの開発

謝辞

本学バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻、佐藤 淳 教授、木村 将大 助教には、研究指導並びに論文作成等、有益な助言を頂きました。そしてお忙しい中、本論文の審査に時間を割いていただきました、本学バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻、矢野 和義 教授、村上 優子 教授、西 良太郎 准教授、岡田 麻衣子 助教には、心から感謝申し上げます。また、公益財団法人佐々木研究所 中村 真男氏には、実験技術並びに資料の作成技法等、様々な助言を頂きました。生物創薬研究室のトルン デイン ハウエーア ン氏には、共同研究者として実験や結果に対するディスカッションなどご助力いただきました。また、当研究室の皆様には、研究分野における知識を賜りました。心より感謝申し上げます。最後に、これまでの生活を支えてくれた母と姉には心より感謝申し上げます。

東京工科大学大学院
バイオ・情報メディア研究科
バイオニクス専攻
生物創薬研究室

栗本 大輔