

氏名（本籍）	おお つか ひろ こ 大塚寛子（栃木県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 884 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	タラの芽由来 aralin の癌細胞選択的細胞毒性の発現機構の解析

論文審査委員	（主査）教授 田代 文夫
	教授 村上 康文 教授 三浦 成敏
	准教授 十島 二郎 教授 深井 文雄

論文内容の要旨

第一章：序論

現在、日本の死因の第一位は悪性新生物いわゆる癌で、心疾患、脳血管疾患を大きく引き離し全体の 3 割を占めており、年間 30 万人以上の方が癌で亡くなっている。癌の治療法には、外科的療法、放射線療法、化学療法、免疫細胞療法がある。抗癌剤には様々カテゴリーが存在し、癌細胞選択的に作用するものも増えてきた一方で、重篤な副作用により治療継続が困難になるといった弊害が生じている。そこで、癌細胞選択的に作用し副作用の少ない抗がん剤の開発が期待される。植物中に広く存在するリボソーム不活性型タンパク質（RIP）は、主に二つのタイプに分けられ、B 鎖を有する type II RIP では高い細胞毒性を発揮することが知られている。Ricin は type II RIP に属し、細胞膜上の糖脂質や末端にガラクトースを付加した糖タンパク質を利用し細胞内へ侵入する。それゆえ、リシンは非特異的な細胞毒性を示す生物兵器として知られている。RIP はイムノトキシンとして多くの研究室で研究され固形腫瘍と血液系腫瘍の両方に有望な治療薬として期待を集めている。タラの芽由来 aralin も type II RIP に属し、正常細胞と比較してヒト子宮頸がん HeLa、膀胱がん T24、膵臓がん MIA PaCa-2、急性前骨髄性白血病 HL-60、卵巣がん OVK18 細胞など人の様々な腫瘍細胞にお

いて選択的にアポトーシスを誘導することが報告されている。Aralin の細胞毒性はガラクトースおよびガラクトースを含む糖の添加によって効率的に抑制された。さらに、TAMRA 標識 aralin を用いた aralin 受容体の解析で、受容体は VA-13 の細胞表面周辺に高い発現を示し、正常細胞では低い発現を示した。aralin 特異的受容体はガラクトースを含むタンパク質であることが示唆された。しかし、aralin 特異的受容体については未だ情報がなく、癌細胞選択的毒性の発現機構は不明なままである。

そこで、本研究では、細胞表面 aralin 受容体タンパク質の同定に焦点をあて、細胞への取り込みと aralin の選択的細胞毒性との関係を解析した。

第二章：Aralin の癌細胞選択的毒性の発現機構の解析

Aralin は 29kDa の A 鎖と 32kDa の B 鎖から構成され、それぞれの N 末端アミノ酸配列は nigrin の A 鎖と ricin の B 鎖と相同性がある。本研究では、HeLa 細胞を用いた細胞膜への結合および糖鎖阻害実験における細胞膜への結合、細胞への取り込みについて解析を行った。Cy3・aralin を用いた細胞膜への結合を調べた結果、細胞膜への結合を観察しその結合が糖の添加によって阻害された。このことから、aralin はガラクトースを含む糖鎖を認識し結合することが明らかとなった。さらに、aralin の取り込みについて Cy5・aralin、ゴルジ体、小胞体・ゴルジ体中間画分、小胞体染色により解析した。その結果、aralin は膜受容体を介したエンドサイトーシスによって取り込まれることが示唆された。Aralin の癌細胞選択的細胞毒性の発現機構を解析するため、細胞膜に存在する aralin 受容体を FWB 解析により検出した。HeLa 細胞を細胞質分画と膜分画に調製し解析した結果、膜分画において 110-kDa のタンパク質が強く検出された。この 110kDa のタンパク質を同定するために LC /MS 解析を行った結果、HDLBP (High density lipoprotein binding protein) だと推定された。HDLBP は 150-kDa の糖タンパク質であり、より小さい形態 (105-110 kDa) にプロセシングされ、HDL 受容体として作用するために細胞膜へと移動する。HDLBP mRNA とタンパク質の発現レベルはコレステロール過剰な細胞において亢進され、HDL を媒介して細胞からコレステロールを除去する役割を果たす可能性が示唆されている。HDLBP の詳細な機能は不明なままである。細胞分画中に発現する HDLBP の発現量を解析した結果、150-kDa HDLBP が細胞質で高く発現しており 110-kDa HDLBP は界面活性剤不溶性分画において高く発現していた。脂質ラフトは細胞膜上のスフィンゴリン脂質やコレステロールに富むマイクロドメ

インで、界面活性剤不溶性の分画にこれらのドメインが回収されるという報告があることからこの分画をもって脂質ラフトと定義している。しかし、HDLBPが脂質ラフトにおいて機能するかは不明である。そこで、コレステロールを抽出する薬剤を用いて HDLBP が脂質ラフトに存在し機能するかを検討した。M8CD 処理によって細胞膜上のコレステロールは除去され 110-kDa HDLBP の発現が減少し aralin 感受性に抵抗を示した。以上のことから、aralin と結合する 110-kDa HDLBP は界面活性剤不溶性分画/脂質ラフトに存在し機能することが示唆された。次に、aralin が各癌細胞で細胞毒性を発揮するか否か、また aralin 感受性と結合能に相関があるか調べるために HeLa 細胞に加えて肝がん細胞由来の HepG2、Huh7 細胞を用いて解析した。その結果、aralin 感受性と結合能は相関することが示された。また 150-kDa HDLBP を過剰発現させた細胞株で aralin 感受性の低下および 110-kDa HDLBP の発現量の増加が見られないのに対し、150-kDa HDLBP 抑制発現細胞株では aralin 感受性の増加および 110-kDa HDLBP の発現量の低下が見られた。これにより、110-kDa HDLBP が aralin 受容体として機能している可能性が示されたため、110-kDa HDLBP 一過性発現を aralin 抵抗性の Huh7 細胞にトランスフェクションさせ解析した。その結果、aralin の IC₅₀ が 166 ng/ml になり VC と比較して細胞膜上への結合も強く観察された。以上の結果より、細胞膜上のラフトに存在するプロセッシングで生じた 110-kDa HDLBP が aralin 受容体として機能していることが示唆された。

第三章：In vivo における Aralin の抗腫瘍性の検討

In vivo における Aralin の抗腫瘍性について解析を行った。HeLa 細胞を皮下移植したヌードマウスに、aralin 2 µg を含むタラの芽粗抽出物の経口投与を週 5 日、3 週間行い腫瘍形成に対する作用を検討した。その結果、PBS を投与したコントロール群と比較してタラの芽粗抽出投与群では、腫瘍体積が小さく腫瘍形成能が 50%以上抑制されることが明らかとなった。また、腫瘍形成後 aralin を経口投与した場合でも抗腫瘍性を発揮するかどうか、さらに HDLBP の発現は *in vivo* でも影響するかどうか解析を行った。HDLBP 過剰発現細胞株および抑制発現細胞株を皮下移植し、腫瘍が 150-200 mm³ 以上になってからタラの粗抽出物 (aralin 1,2,3 µg 含有) をそれぞれ 19,7,7 日間経口投与した。その結果、過剰発現細胞株を移植したマウスではコントロール群と比較して腫瘍形成が抑制された。しかし、抑制発現細胞株を移植したマウス

ではコントロール群と比較して腫瘍形成への抑制は見られなかった。以上の結果より、腫瘍形成後の aralin 投与は腫瘍の成長を抑制し、HDLBP の発現は aralin による腫瘍抑制能に影響を及ぼすことが示された。

第四章：総括

本研究では、aralin 受容体である HDLBP を同定し HDLBP の機能獲得および機能損失解析に基づいて、プロセッシングされた 110-kDa HDLBP が脂質ラフトにおいて aralin 受容体として機能し、*in vivo* で HeLa 細胞の腫瘍抑制を導くことを明らかにした。また、110-kDa HDLBP を仲介してエンドサイトーシスによって取り込まれることが示唆された。さらに、HDLBP 過剰発現細胞株において VC よりも腫瘍形成を抑制することが示唆された。これは、*in vitro* の aralin 感受性とは異なる結果であったが、*in vivo* において 150-kDa HDLBP が様々な生理活性により *in vitro* よりも効率的に 110-kDa HDLBP をプロセッシングしたことに起因すると考えられる。さらに、HDLBP 抑制発現細胞株を皮下移植したマウスではコントロール投与群での VC と比較して腫瘍形成が低下していたことから、HDLBP が腫瘍形成に影響を与えていることが考えられる。これらの結果は aralin が HDLBP の過剰発現した腫瘍への抗癌剤として有望な候補であることを支持するものであり、癌細胞選択的な抗癌剤の開発に貢献できると考えられる。また、HDLBP を癌抗原とする新たな癌診断マーカーへの応用が期待される。今後、HDLBP のプロセッシングの解析や HDLBP に付加される糖鎖を解析することにより、さらに詳細な aralin の癌細胞選択性のメカニズムを明らかにすることができると考える。

論文審査の結果の要旨

第一章：序論

現在、日本の死因の第一位は悪性新生物いわゆる癌で、心疾患、脳血管疾患を大きく引き離し全体の 3 割を占めており、年間 30 万人以上の方が癌で亡くなっている。癌の治療法には、外科的療法、放射線療法、化学療法、免疫細胞療法がある。抗癌剤には様々なカテゴリーが存在し、癌細胞選択的に作用するものも増えてきた一方で、重篤な副作用により治療継続が困難になるといった弊害が生じている。そこで、癌細胞選択的に作用し副作用の少ない抗がん剤の開発が期待される。植物中に広く存在するリボソーム不活性型タンパク質 (RIP) は、主に二つのタイプに分けられ、B 鎖を有する type II RIP では高い細胞毒性を発揮することが知られている。ヒマ種子に含まれる ricin は type II RIP に属し、細胞膜上の糖脂質や末端にガラクト

ースを付加した糖タンパク質を利用し細胞内へ侵入する。それ故、ricin は非特異的な細胞毒性を示す生物兵器として知られている。RIP はイムノトキシンとして多くの研究室で研究され固形腫瘍と血液系腫瘍の両方に有望な治療薬として期待を集めている。タラの芽由来 aralin も type II RIP に属し、正常細胞と比較してヒト子宮頸がん HeLa、膀胱がん T24、膵臓がん MIA PaCa-2、急性前骨髄性白血病 HL-60、卵巣がん OVK18 細胞など様々なヒト腫瘍細胞において選択的にアポトーシスを誘導することが報告されている。aralin の細胞毒性はガラクトースおよびガラクトースを含む糖の添加によって効率的に抑制された。さらに、TAMRA 標識 aralin を用いた aralin 受容体の解析で、受容体は VA-13 の細胞表面周辺に高い発現を示し、正常細胞では低い発現を示した。aralin 特異的受容体はガラクトースを含むタンパク質であることが示唆された。しかし、aralin 特異的受容体については未だ情報がなく、癌細胞選択的毒性の発現機構は不明なままである。そこで、本研究では、細胞表面 aralin 受容体タンパク質の同定と共に、aralin の細胞への取り込みと選択的細胞毒性発現における役割について解析を試みている。

第二章：Aralin の癌細胞選択的毒性の発現機構の解析

aralin は 29kDa の A 鎖と 32kDa の B 鎖から構成され、それぞれの N 末端アミノ酸配列は nigrin の A 鎖と ricin の B 鎖と相同性がある。本研究では、蛍光標識 aralin を用いて HeLa 細胞の細胞膜への結合、各種糖存在下における細胞膜への結合、細胞への取り込みについて解析を行った。Cy3-aralin を用いた細胞膜への結合を調べた結果、細胞膜への結合を観察しその結合が糖の添加によって阻害された。このことから、aralin はガラクトースを含む糖鎖を認識し結合することが明らかとなった。さらに、aralin の取り込みについて Cy5-aralin、ゴルジ体、小胞体・ゴルジ体中間画分、小胞体染色により解析した。その結果、aralin は膜受容体を介したエンドサイトーシスによって取り込まれることが示唆された。aralin の癌細胞選択的細胞毒性の発現機構を解析するため、細胞膜に存在する aralin 受容体を FWB 解析により検出した。HeLa 細胞を細胞質分画と膜分画に調製し解析した結果、膜分画において 110-kDa のタンパク質が強く検出された。この 110kDa のタンパク質を同定するために LC/MS 解析を行った結果、HDLBP (High density lipoprotein binding protein) であることが推定された。HDLBP は 150-kDa の糖タンパク質であり、より小さい形態 (105-110 kDa) にプロセッシングされ、HDL 受容体として機能するために細胞膜へと移動する。HDLBP mRNA とタンパク質の発現レベルはコレステロール過剰な細胞において亢進されることより、HDL を媒介して細胞から過剰なコレステロールを除去する役割を果たしている可能性が報告されている。HDLBP の詳細な機能制御については不明であるため、細胞分画中に発現する HDLBP の発現量を解析したところ、150-kDa HDLBP は細胞質で高く発現されており、一方 110-kDa HDLBP は界面活性剤不溶性分画において高く発現されていた。脂質ラフトは細胞膜上のスフィンゴリン脂質やコレステロールに富むマイクロドメインで、界面活性剤不溶性の分画にこれらのドメインが存在するという報告があることから、この分画をもって脂質ラフトと定義されている。しかし、HDLBP が脂質ラフトにおいて機能するかは不明である。そこで、コレステロールを除去する薬剤を用いて HDLBP が脂質ラフトにおいて機能しているかどうかを検討した。MBCD 処理によって細胞膜上のコレステロールを除去すると 110-kDa HDLBP の発現量が減少し、aralin の細胞毒性が著しく減少した。これらの結果より、aralin と結合する 110-kDa HDLBP は界面活性剤不溶性分画/脂質ラフトに存在してコレステロール輸送に機能していることが示唆された。次に、aralin が各種癌細胞に対して細胞毒性を発揮するか否か、また aralin 感受性と結合能に相関があるか調べるために HeLa 細胞に加えて肝がん細胞由来の HepG2、Huh7 細胞を用いて解析した。その結果、

aralin 感受性と 110-kDa HDLBP との結合能は相関することが示された。また、単に 150-kDa HDLBP を過剰発現させた細胞株では aralin 感受性の変化および 110-kDa HDLBP の発現量の増加が見られないのに対し、150-kDa HDLBP 抑制発現細胞株では aralin 感受性の増加および 110-kDa HDLBP の発現量の低下が見られた。これにより、110-kDa HDLBP が真の aralin 受容体として機能している可能性が示されたため、110-kDa HDLBP cDNA 発現ベクターを aralin 抵抗性の Huh7 細胞 ($IC_{50} > 1000$ ng/ml) に導入して解析した。その結果、aralin の IC_{50} が 166 ng/ml になり、さらに VC と比較して aralin の細胞膜上への強い結合が観察された。以上の結果より、細胞膜上のラフトに存在するプロセッシングで生じた 110-kDa HDLBP が真の aralin 受容体として機能していることが明らかとなった。

第三章：In vivo における Aralin の抗腫瘍性の検討

In vivo における Aralin の抗腫瘍性について解析を行った。HeLa 細胞を皮下移植したヌードマウスに、aralin 2 μ g を含むタラの芽粗抽出物の経口投与を週 5 日、3 週間行い腫瘍形成に対する作用を検討した。その結果、PBS を投与したコントロール群と比較してタラの芽粗抽出投与群では、腫瘍体積が小さく腫瘍形成能が 50%以上抑制されることが明らかとなった。また、腫瘍形成後 aralin を経口投与した場合でも抗腫瘍性を発揮するかどうか、さらに HDLBP の発現量が in vivo でも影響するかどうか解析を行った。HDLBP 過剰発現細胞株および抑制発現細胞株を皮下移植し、腫瘍が 150-200 mm³ 以上になってからタラの粗抽出物 (aralin 1,2,3 μ g 含有) をそれぞれ 19,7,7 日間経口投与した。その結果、過剰発現細胞株を移植したマウスではコントロール群と比較して腫瘍形成が抑制された。しかし、抑制発現細胞株を移植したマウスではコントロール群と比較して腫瘍形成への抑制は見られなかった。以上の結果より、腫瘍形成後の aralin 投与は腫瘍の成長を抑制し、HDLBP の発現量は aralin による腫瘍抑制能に影響を及ぼすことが示された。

第四章：総括

本研究では、aralin 受容体である HDLBP を同定し HDLBP の機能獲得および機能損失解析に基づいて、プロセッシングされた 110-kDa HDLBP が脂質ラフトにおいて aralin 受容体として機能し、エンドサイトーシスを介して aralin の細胞内へ取り込み、腫瘍抑制に関与していることを明らかにしている。

本研究で得られた知見は、aralin が HDLBP を過剰に発現している癌細胞に対して有望な抗癌剤候補になり得ることを示しており、新規抗癌剤の開発に大いに貢献することが期待される。さらに、過剰に発現された HDLBP は新たな癌診断マーカーとして応用が可能である。依って、本論文は博士 (工学) 論文として十分価値あるものと認められる。