HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Creation of anticancer nanomedicine targeting lysosomal glycosidases [an abstract of entire text]
Author(s)	小出, 亮介
Citation	北海道大学. 博士(生命科学) 甲第13825号
Issue Date	2019-12-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/76608
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当:理学部図書室】
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Ryosuke_KOIDE_summary.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　の　要　約

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏　名　　小出　亮介

学　位　論　文　題　名

Creation of anticancer nanomedicine targeting lysosomal glycosidases
（がん細胞のリソソーム糖分解酵素を標的とするナノ医薬の創出）

リソソームは癌細胞において重要な役割を果たしており、エンドサイトーシスやオートファジーといった癌の代謝・成長活動において重要な働きを担っている。リソソームは代謝活動において分解酵素による分解・消化の役割を果たしており、リソソームで分解された糖やアミノ酸は癌成長のエネルギーとしてリサイクルされる。特に、糖は癌においては重要なエネルギー源でありリソソームによる糖分解酵素によって消化された後、細胞内で糖ヌクレオチドへと変換され癌細胞表面の糖鎖の原料として利用される。そして、癌細胞では代謝が活発化になった影響により多分岐型 N 結合型糖鎖の過剰発現が見られるようになる。多分岐型 N 結合型糖鎖の過剰発現は代謝の活発化によってリソソーム内部において N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が大量に分解・生産されることで細胞内 UDP-GlcNAc 濃度が上昇して引き起こされる。よって、癌細胞におけるリソソーム糖分解酵素は癌の成長において必要な糖を供給するという重要な役割を担っており、リソソーム糖分解酵素の阻害が癌の進行を抑制するのではないかと考えた。そして、リソソーム内部に局在する酵素をターゲットとするためにナノ粒子に着目した。ナノ粒子は金ナノ粒子、量子ドット、磁性ビーズなど様々な種類が存在するが Enhanced permeability and retention Effect(EPR 効果)によって腫瘍に蓄積しやすく、癌細胞で活発化しているエンドサイトーシスによって癌細胞特異的に取り込まれやすいといった特徴を持つ。特にエンドサイトーシスによって取り込まれることでリソソームに局在するという報告もあり、リソソーム局在性酵素をターゲティングするためのツールとして非常に有用である。しかし、課題もまだ残っており、ナノ粒子表面におけるプロテインコロナの形成といった血中タンパクの不特異吸着などによって思わぬ毒性を示してしまったり、肝臓への蓄積性が大きく増加してしまったりといった問題点が挙げられる。当研究室では金属ナノ粒子の表面を生体膜に存在しているホスホリルコリン基をミミックしたリガンド（PC リンカー）で被膜を行うことで生体膜をミミックしたナノ粒子（ナノソーム）を開発し、従来の PEG 被膜を行ったナノ粒子と比較して水溶性・安定性ともに大きく向上させることに成功している。また、ヒスチジンタグ（His6 タグ）をナノ粒子表面に提示することでプロトンポンプ効果によってナノ粒子をリソソーム外へ逃がす技術も開発された。そこで、本学位論文ではこのナノソームを利用することによって癌細胞内部のリソソームに局在する糖分解酵素を標的とした新たな抗癌剤の開発を目的とした。

2 章ではナノソームの FCS を用いたタンパク非特異的吸着阻害能の評価を行い、さらに自殺基質型糖分解酵素阻害剤の合成とそのナノソーム上への担持、及びキャラクタリゼーションを行った。ナノソームの血中における安定性試験では様々な割合の PC 及び PEG リンカーで被膜を行ったナノ粒子の 100%血清中における挙動を FCS により評価した。その結果ナノ粒子表面の PC リンカーの割合が 20%以上で血清中におけるナノ粒子の凝集及びタンパクの非特異吸着が見られなくなった。また、PEG リンカーのみで被膜を行ったナノ粒子は凝集してしまい、血清中におけるタンパク質の非特異的吸着が起こってしまった。このことから PC 被膜ナノ粒子は既存のナノ粒子で大きな問題となっていたタンパク質の非特異的吸着を防ぎ新たな DDS のデバイスとして有用であることが示された。また、糖分解酵素阻害剤として癌細胞に多く発現していると報告さ

れている二種類の糖分解酵素（β-ヘキソサミニダーゼ、ガラクトシダーゼ）を標的とした自殺基質型阻害剤の合成に成功し、これらの自殺基質を提示したナノ粒子（NS-8101、NS-8102）の合成も完了した。その後、ナノ粒子表面 Z 電位の評価を行ったところ表面に提示した基質によって表面電荷に大きな変化が見られ、PC 被膜を行ったものは-21.4mV であったのに対して、NS-8101 および NS-8102 はそれぞれ-13.43mV,-15.41mV であることが判明した。しかし、ナノ粒子の安定性には影響を及ぼさず、NS-8101 の血清中における挙動を FCS によって評価したところタンパクの非特異的吸着や凝集は見られなかった。また、ナノ粒子表面に提示を行うことで阻害剤自体の阻害能の向上も確認され、フリーの阻害剤では Ki 値が 5.4mM であったのに対して、ナノ粒子に提示を行ったところ Km 値が 5.2μM になり阻害能が 1000 倍向上することが判明した。

3 章ではこれらのナノ粒子の活性評価を *in vitro* 及び *in vivo* で行った。蛍光性ナノ微粒子量子ドットを用いた生細胞イメージングではヒト肝臓癌細胞（HepG2 細胞）を用いて行ったところ、PC 被膜のみを行ったナノ粒子はエンドサイトーシスによって取り込まれリソソームへの局在が確認できた。しかし、糖分解酵素阻害剤を担持したナノ粒子は 1 時間程度の段階ではリソソームへの局在が見られたが、2 時間経過するとリソソーム外へ抜け出してしまっているものが見られた。また、他の癌細胞株でも同様の傾向が見られ、乳癌細胞株においても同様の結果となった。その後 MTT アッセイによる癌細胞への毒性評価を行ったところ HepG2 に対して NS-8101 は IC50 値が 10,7nM、NS-8102 は 59.3nM と強力な活性を示すことが判明した。また、乳癌細胞にも同様に抗癌活性が確認された。さらに、浸潤性乳癌細胞 MDA-MB-231 と非浸潤性乳癌細胞 MCF-7 への活性を比較したところそれぞれ IC50 値が 31.8nM,95.3nM となり、代謝活動が活発になっている浸潤性乳癌細胞に対してより効果を発揮することが判明した。そして、これらの結果からリソソームにおいてナノ粒子表面の自殺基質と酵素が共有結合を形成することでナノ粒子表面が酵素によって被膜され、リソソーム内部において凝集しリソソーム膜を破壊することで細胞内部にリソソーム酵素を放出しアポトーシスを引き起こして癌細胞を死滅させているのではないかと考えられた。さらに、NS-8101 に His6 タグを共存させナノ粒子をリソソームと融合する前段階、つまり初期エンドソーム膜を破壊して外へ逃がしたところ毒性を示さなくなった。このことから NS-8101 はリソソーム膜と融合した状態で膜破壊を引き起こし、細胞内部に酵素を放出して癌細胞に対して毒性を示すという仮説を裏付ける結果となった。また、NS-8101 を様々な条件下で HepG2 細胞へアッセイしその挙動を追跡したところ、10mMGlcNAc 共存下ではほとんど取り込まれなくなり、さらにカリウムを除いた条件下では細胞膜表面に吸着し、内部に取り込まれないことが判明した。このことから癌細胞はナノ粒子表面の糖を認識してクラスリン経由エンドサイトーシスによってナノ粒子を取り込んでいることが判明した。その後 *in vivo* 試験において HepG2 細胞を植え付けたヌードマウスに対して尾静脈投与により NS-8101 を 4 日間隔投与し、25 日間腫瘍の観察を行ったところ化合物の提示を行っていない NS 及び生理食塩水を投与した群と比較して有意に腫瘍の成長を有意に抑制することが判明した。さらに、近赤外蛍光を持つ量子ドットを用いて生体内の動態追跡を行ったところ N-アセチルグルコサミンの影響によって多くが肝臓に集積してしまったが、腫瘍にも一部蓄積していることが確認された。この結果からナノ粒子は腫瘍までたどり着いて効果を発揮したことが明らかとなった。

本学位論文では PC リンカーによって被膜を行ったナノ粒子（ナノソーム）を用いることによりタンパクの非特異的吸着を完全に抑制し、さらに糖とレクチンのような弱い相互作用を利用した薬物輸送が可能となった。さらに、ナノソームを利用することで癌細胞内リソソーム酵素のターゲティングに成功し、リソソーム局在糖分解酵素と結合することでリソソーム膜を破壊して癌を死滅させる新たな作用機序の抗癌剤の開発にも成功した。これらの結果からナノソームを用いた薬物輸送システムの新たな可能性が示唆された。