

京都大学	博士 (医科学)	氏名	稗谷隼世
論文題目	Non-Genetic Cell-Surface Modification with a Self-Assembling Molecular Glue (自己集合性分子糊による遺伝子操作を用いない細胞表面修飾法)		
(論文内容の要旨)			
<p>近年、再生医療における細胞治療が新たな疾患治療モダリティとして注目されている。一方、移植細胞の生存率が低いことや、免疫拒絶が問題となり、理想的な治療効果を上げるには至っていない。遺伝子操作を用いて細胞表面に機能性タンパク質を発現させることで、こうした問題を克服しようとする報告は存在するものの、悪性形質転換が主要な懸念となっている。この課題を克服するために本研究では、細胞表面に自己集合する生理活性分子 Adhesamine3.0 (adh3.0)による機能性タンパク質の細胞表面修飾法を提案する。adh3.0 はアルキルクロライド構造を有し、Halo-tag タンパク質と共有結合を形成することができるため、Halo-tag を融合したリコンビナントタンパク質と反応させることで細胞表面に対する機能性タンパク質の修飾を可能とする。</p> <p>転移する癌細胞が有する特徴的な機能として、「細胞生存活性の維持」、「免疫回避」、「浸潤」、「血管新生」が知られている。そこで、細胞移植における生着効率の向上に対してもこれらの機能が効果的ではないかと着想し、本研究では細胞表面修飾するタンパク質として「癌転移」に着目した。まず、癌転移に関連していると報告されている Programmed death ligand-1 (PD-L1), angiopoietin-2 (Ang-2), vascular endothelial growth factor (VEGF-A)の3種の機能性タンパク質に Halo-tag を融合した。PD-L1 は悪性腫瘍の免疫回避を担うタンパク質であり、Ang-2 および VEGF-A は腫瘍細胞の遊走能や血管新生能に関与する。</p> <p>NIH3T3 細胞にこれらの融合タンパク質と adh3.0 を処理し、抗 HaloTag 抗体によって免疫染色したところ、Halo-tag 融合タンパク質由来の蛍光が細胞表面に観察された。次に、これらの細胞表面修飾が細胞に機能を与えることを確認する実験を行った。まず最初に、分泌型 PD-L1 の Halo-tag 融合タンパク質 (secPDL1-H)による免疫回避能を評価した。secPDL1-H による表面修飾を施した NIH3T3 細胞と PD-1 過剰発現 Jurkat 細胞とを共培養し、Jurkat 細胞からの IL-2 の産生量を ELISA によって評価したところ、Jurkat 細胞の IL-2 産生量は、表面修飾を施した NIH3T3 細胞との共培養によって有意に抑制された。共培養系に抗 PD-1 抗体を添加すると IL-2 産生量が元に戻ることから、本抑制は PD-1 / PD-L1 相互作用に起因することが示唆された。</p> <p>次に、Halo-tag タンパク質を融合した Ang-2 (ANG2-H), 同 VEGF-A(VEGF-H) による細胞遊走能を評価した。創傷治癒アッセイの結果、adh3.0 とそれぞれの融合タンパク質を処理すると NIH3T3 細胞の遊走能は有意に上昇した。Ang-2、および VEGF は相互が協調的に働くことによって、細胞の遊走・血管新生能を促進することが知られている。実際、adh3.0 と ANG2-H、VEGF-H の3者を同時処理すると、単独タンパク質による細胞表面修飾よりも有意に細胞遊走能が上昇した。同時に2タンパク質が表面修飾されられることを確認するために免疫二重染色を行ったところ、確かに抗 Ang2 抗体、抗 VEGF-A 抗体の両者に起因する細胞表面の染色が観察された。</p>			

<p>次に、血管新生アッセイキットを用いてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の血管新生能を評価した。細胞を adh3.0 と ANG2-H または VEGF-H によって処理すると、血管分岐点の数が有意に上昇した。一方、adh3.0 単独、Halo-tag 融合タンパク質単独ではこうした血管分岐点の増加現象は見られなかった。これらの結果は、adh3.0 を用いた ANG2-H または VEGF-H の細胞表面修飾が HUVEC の血管新生能を高めたことを示唆する。本評価系においても、ANG2-H、VEGF-H の相乗的な血管新生促進の効果が確認された。</p> <p>本研究では、自己集合性小分子化合物と Halo-tag 融合タンパク質を用いて、汎用性のある細胞表面修飾法を開発した。この細胞表面修飾法により、細胞の遺伝子を改変せずに複数の機能性タンパク質を細胞表面に提示し、免疫回避・遊走・血管新生能を細胞に付与することが可能となった。臨床応用に向けては更なる安全性評価や動物実験を要するものの、本技術は将来の細胞治療に役立つ可能性があるとして期待される。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>新たな疾患治療モダリティとして細胞治療が注目されているものの、移植細胞の低生存率や免疫拒絶が問題となる場合が多い。こうした問題を克服するために、遺伝子を導入して機能性タンパク質を細胞表面に発現させるアプローチが存在する。しかし、遺伝子導入の主要な懸念は悪性形質転換である。本学位論文では、遺伝子を導入せずに機能性タンパク質で細胞表面を修飾する方法を開発している。</p> <p>本学位論文では、adh3.0 という小分子化合物を利用した。adh3.0 はヘパラン硫酸と結合し、細胞表面にサブミクロンサイズの自己集合体を形成する。また、adh3.0 はアルキルクロライド構造を介して Halo-tag タンパク質と共有結合を形成するので、Halo-tag を融合した機能性タンパク質を細胞表面に提示することができる。学位申請者らは、がん浸潤に関わる3種の機能性タンパク質 (Programmed death ligand-1 (PD L1), angiopoietin-2 (Ang-2), vascular endothelial growth factor (VEGF-A)) をとりあげ、それらの Halo-tag 融合タンパク質で細胞表面を修飾することに成功した。PD-L1 による免疫回避能の獲得、Ang-2・VEGF による遊走・血管新生能の促進を細胞レベルで確認している。</p> <p>以上の研究は、遺伝子導入を用いずに細胞表面を修飾する方法を提案し、細胞治療研究に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士 (医科学) の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 3 年 2 月 17 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>

要旨公開可能日： 年 月 日以降