

氏名(本籍)	李 冬 平 (中 国)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 5822 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	<b>Binding of lactoferrin to IGBP1 triggers apoptosis in a lung adenocarcinoma cell line</b> (肺腺癌におけるラクトフェリンと IGBP1 の結合によるアポトーシス誘導)
主 査	筑波大学教授 薬学博士 幸 田 幸 直
副 査	筑波大学講師 博士(医学) 本 多 伸一郎
副 査	筑波大学講師 博士(医学) 栗 島 浩 一
副 査	筑波大学講師 博士(医学) 後 藤 行 延

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

ラクトフェリン (Lf) はトランスフェリン family に属する 80kDa の鉄結合タンパクで、粘膜上皮細胞に発現しており、哺乳類の分泌物中に広く存在している。過去の研究では、抗ウイルス、抗発がん、抗炎症あるいは免疫調節など多くの機能をもつことが示唆され、宿主の防衛因子として重要な役割を果たしていると考えられている。著者らは、NNK (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) を投与した A/J マウスの腫瘍形成前期において、Lf が過剰発現すること、また bovine Lf (bLf) を吸入させることにより肺腺癌の発生率および形成数が低下することを明らかにした。

本研究では、bLf 及び肺腺癌細胞株 (PC-14) を用いて肺腺癌に対する Lf の作用を解明し、Lf と特異的に結合するタンパクを同定して、アポトーシス誘導作用を検討する。

### (対象と方法)

材料：bLf タンパク粉末と PC-14 を含むヒト肺腺癌細胞株 7 株。

研究方法：肺腺癌細胞株の生存性及び増殖速度に対する bLf の効果を WST-1 法で確認した。アポトーシス関連遺伝子 APAF-1 と cleaved Caspase-3 の発現を realtime RT-PCR、あるいは western blotting 法で解析した。bLf によって誘導されるアポトーシスの分子機構を解明するため、bLf をプローブとしてプロテインマイクロアレイを行い、同定されたタンパクと Lf との関係を免疫共沈降法と二重蛍光免疫染色で解析した。プロテインマイクロアレイから同定されたタンパク及びその機能と Lf 誘導アポトーシスの関係を脱リン酸化酵素活性アッセイ、Phospho-Bcl-2 蛍光免疫染色で解析した。

### (結果)

1. 7 種のヒト肺腺癌細胞株を終濃度 1.25 $\mu$ M bLf タンパクで 72 時間処理したところ、3 種に有意な増殖の抑制を認めた。次に bLf の効果が濃度依存性であることを確かめるため、種々の bLf 濃度における PC-14 細胞株の増殖効果を WST-1 assay で調べた。bLf を段階的に増量していくと濃度依存的に増殖が抑制された。アポトーシス関連遺伝子 APAF-1 の realtime RT-PCR と Caspase-3 の western blotting の発現を解析すると、

bLfはPC-14におけるAPAF-1の発現とcleaved Caspase-3の発現を促進していた。以上より、bLfは肺腺癌細胞のアポトーシスを誘導することによって肺腺癌細胞の増殖を抑制することがわかった。

2. bLfによって誘導されるアポトーシスの分子機構を解明するため、bLfをプローブとしてプロテインマイクロアレイを行い、Lfと結合する性質をもつタンパクを網羅的にスクリーニングした結果、bLfと結合する258のタンパクが同定された。immunoglobulin binding protein1 (IGBP1)が、Lfと最も強く結合することがわかった。IGBP1はBリンパ細胞抗原レセプター (BCR) 複合体を形成するIgα (MB-1/CD79a) と結合する新規シグナル伝達分子として同定されたタンパクであり、脱リン酸化酵素PP2Aのcサブユニットと直接結合し、PP2A酵素活性を制御している。bLf、IGBP1とPP2Acの相互作用を確かめるために免疫共沈降法を用いて解析した。その結果、bLfはIGBP1と結合することによってPP2Aの機能を制御することが示された。LfとIGBP1抗体で二重染色をした結果、Lfで処理した細胞には、LfとIGBP1の細胞核内局在を認めたが、LfとPP2Ac抗体の二重染色の結果、Lfと結合したPP2Acの細胞内局在は認められなかった。

3. 脱リン酸化酵素PP2Aに対するbLfの機能を脱リン酸化酵素活性によって解析した。PP2A活性はbLfを添加することによって阻害された。Lf誘導性アポトーシスがPP2A - Bcl-2経路を介することを調べるため、リン酸化Bcl-2の蛍光免疫染色を行った。Lf処理細胞においてリン酸化Bcl-2が観察され、LfはPP2A - Bcl-2経路を通じてアポトーシスを誘導することが示唆された。

#### (考察)

LfはG1タンパクの発現を抑制し、またVEGFの関与する血管増生を阻害して、アポトーシスを助長するなどの報告があり、著者らの研究でも、Lfの吸入暴露で肺腺癌の発生率及び形成数の低下が認められている。本研究では、肺腺癌におけるLfの直接抗癌作用とそのメカニズムを網羅的に解析したが、PC-14を含むいくつかの肺腺癌細胞株において、LfはCaspase-3を分解させ、アポトーシスを誘導していることがわかった。Lfの生物学的効果は標的細胞や特異的な受容体の存在に依存しているため、肺腺癌に対する抗癌作用についてLf受容体をプロテインマイクロアレイ、免疫共沈降法と二重免疫蛍光染色で解析したところ、Lfは一部のIGBP1と結合することによってPP2A脱リン酸化酵素活性を阻害し、アポトーシスを誘導することがわかった。また、免疫共沈降の結果から見ると、Lfと結合していないIGBP1-PP2Ac複合体が相当量残っていることも明らかになった。今後LfとIGBP1との特異的結合部位を確定し、機能性ペプチドを大量投与することでできれば、Lfのアポトーシス促進機能をさらに高めることができると考えている。

#### (結論)

外因性のLfが細胞質内に取り込まれ、細胞質内のIGBP1と結合し、結果的にPP2Aの脱リン酸化機能を阻害することでアポトーシスが誘導されることを明らかにした。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

著者らの過去の研究から、ラクtofエリン (Lf) の吸入暴露によって肺腺癌の発生率及び形成数の低下が認められることが判明していたことから、本研究においては、bovine Lf タンパク及び肺腺癌細胞株 (PC-14) を用いて、Lfと特異的に結合する蛋白immunoglobulin binding protein1 (IGBP1) を同定し、外因性のLfが細胞質内に取り込まれ、細胞質内のIGBP1と結合し、結果的にPP2Aの脱リン酸化機能を阻害することでアポトーシスが誘導されることを明らかにした。

今後の課題ではあるが、LfとIGBP1との特異的結合部位を確定し、機能性ペプチドを大量投与することでできれば、Lfのアポトーシス促進機能をさらに高めることができると考えられ、本研究は今後の新規抗癌薬の創薬研究において重要な知見を提供したものと評価できる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。