

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	井尻 学見
学位論文題目			
<p>Ferrichrome identified from <i>Lactobacillus casei</i> ATCC334 induces apoptosis through its iron binding site in gastric cancer cells (胃癌細胞において、<i>Lactobacillus casei</i> ATCC334から 同定されたフェリクロームはその鉄結合部位を介して アポトーシスを引き起こす)</p>			
共著者名			
<p>藤谷 幹浩, 小西 弘晃, 田中 宏樹, 上野 伸展, 嘉島 伸, 盛一 健太郎, 笹島 順平, 生田 克哉, 奥村 利勝</p>			
印刷公表の方法及び時期			
Tumor Biology			
未掲載			
研究目的			
<p>宿主の健康に良い影響を与える微生物はプロバイオティクスと総称され、抗腫瘍作用を持つという研究が報告されている。プロバイオティクスが産生する抗腫瘍物質を同定できれば、新しい抗癌剤の開発につながると考えられる。</p> <p>我々の研究室では、プロバイオティクスの一種である <i>Lactobacillus casei</i> ATCC334 (<i>L. casei</i>) の培養上清に大腸癌に対する抗腫瘍作用を有することを明らかにし、さらに菌由来の抗腫瘍活性物質であるフェリクロームを分離同定した。フェリクロームは周囲の環境から細菌が鉄を取り込む際に使用するシデロフォア的一种として知られているが、抗腫瘍作用については未知の物質であった。これまでに、フェリクロームが大腸癌細胞に対して5-FUやシスプラチンなどの既存の抗癌剤よりも強い抗腫瘍作用を持つことを証明してきたが、その詳細なメカニズムや大腸癌以外の癌種に対する効果は不明である。</p> <p>そこで、本研究では胃癌に対するフェリクロームの抗腫瘍作用を検討し、その作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 細胞株

胃癌細胞株としてMKN-7、MKN-45、MKN-74、NUGC細胞を用いた。

2. スルフォローダミンB(SRB)アッセイ

MKN-7、MKN-45、MKN-74にフェリクロームを投与し、24、72、120時間後に細胞を10%トリクロロ酢酸中で固定した。その後、0.057%SRB液で染色し乾燥させた。染色した細胞をトリス緩衝液で溶解し、OD_{510nm}を測定した。

3. MTTアッセイ

NUGCにフェリクロームを投与し、24、72、120時間後にMTT cell proliferation kit Iを用いて細胞を固定し、OD_{570nm}を測定した。

4. Xenograftモデル

ヌードマウス (BALB/c^{nu/nu}) を用いた。抗アジアロGM1抗体を投与後、マウスの背中にMKN-45を皮下移植した。翌日より連日フェリクローム100 μ gを腹腔内投与し腫瘍の大きさを計測した。

5. Real-time PCR

ランダムプライマーを用いてRNAを逆転写し、DDIT3特異的プライマーを用いてPCRを行った。18S rRNAの発現量を内部コントロールとして標準化した。

6. Western blotting

回収した蛋白を12.5% SDS-PAGEにて泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。各種一次抗体と反応させた後、特異的二次抗体と反応させ発色した。アクチンの発現量を内部コントロールとして標準化した。

7. フローサイトメトリー

細胞にフェリクロームを投与し、72時間後にPBSとエタノールで固定した。プロピジウムイオダイドで染色しBD FACSCaliburで測定した。

8. 質量分析

フェリクローム単独、およびフェリクロームと等モル濃度のFeCl₃を投与したサンプルを用いた。Nano Frontier eLD Liquid Chromatography Mass Spectrometerで測定した。

9. 原子吸光分光法

細胞にフェリクロームを投与し、24時間後に硝酸で固定した。細胞の鉄含有量についてZ-8100を用いて測定した。

10. 分子立体配座解析

フェリクロームの分子構造から、リガンド構造と結合可能なタンパク質を解析するソフト (MOE software) を用いた。プロテインデータベースに登録された34495種のタンパクリストから、安定的に結合する蛋白を解析した。

11. 統計処理

Student's t-testでは $p < 0.05$ を、また多群比較ではANOVA解析を施行し、ボンフェローニ補正で $p < 0.0083$ または 0.017 を統計学的に有意な差と判断した。

成 績

1. フェリクロームの腫瘍抑制作用の検討

胃癌細胞株にフェリクロームを投与すると、投与濃度依存性に72-120時間後の細胞生存率がコントロールと比較して有意に低下した。しかし、細胞によって抗腫瘍効果が発現する濃度は異なっており、MKN-7、MKN-45では1 μ g/mLの低用量から、MKN-74、NUGCでは100 μ g/mLの高用量から、抗腫瘍効果がみられた。また、Xenograftモデルでは、コントロールと比較して優位に腫瘍の増殖抑制が認められた。

2. フェリクローム投与後のアポトーシスの検討

胃癌細胞株にフェリクロームを投与したところ、cleaved PARPの発現が有意に上昇した。また、フェリクロームを投与することでJNK、DDIT3の発現が有意に上昇した。

3. 鉄でキレートされたフェリクロームの抗腫瘍作用の検討

質量分析で、フェリクロームに等モル濃度の鉄を加えると、1:1の結合による質量変化を認めた。等モル濃度の鉄と結合したフェリクロームを胃癌細胞株に投与したところ、その抗腫瘍効果が消失した。フェリクロームを投与した時の細胞鉄含有量の変化を測定したところ、いずれの細胞においても同様の細胞鉄含有量の低下を認めた。すなわち、細胞鉄含有量の低下とフェリクロームの抗腫瘍効果は相関しなかった。

4. フェリクロームとの結合で安定的構造をとるタンパク質の解析

MOE softwareを用いて34495種のタンパク質とのシミュレーション解析を行った。鉄と結合していないフェリクロームは、30種類のヒト由来蛋白と結合可能であったが、鉄と結合したフェリクロームでは、いずれのヒト由来蛋白との結合も不可能であると考えられた。

考 案

本研究では、*L. casei*より分離したフェリクローム投与により、胃癌細胞においてJNK-DDIT3経路を介して、濃度依存性にアポトーシスが誘導されることを明らかにした。

フェリクロームは微生物由来シデロフォア的一种であり、鉄結合部位を持ち、外界から鉄を取り込むための担体として機能している。そこで、この鉄結合部位がフェリクロームの抗腫瘍作用と関係しているか否かを明らかにするため、鉄処理を行って鉄結合フェリクロームを用いて検討した結果、胃癌細胞に対する抗腫瘍効果は消失した。したがって、フェリクロームが抗腫瘍効果を発揮するうえで、鉄結合部位が必須の構造であることが明らかになった。一方、フェリクローム投与による胃癌細胞内の鉄含有量変化を測定したところ、いずれの細胞においても同様の細胞鉄含有量の低下を認め、細胞間での差はなかった。フェリクロームの抗腫瘍効果は細胞間で大きく異なっていることから、フェリクロームによる鉄動態の変化はその抗腫瘍効果と無関係であると考えられた。

以上から、フェリクロームの鉄結合部位に何らかの細胞内分子が結合し抗腫瘍作用が発揮される可能性が示された。そこで、立体配座のシミュレーション解析により、フェリクロームの鉄結合部位を介して結合し得るヒト由来の蛋白質を探索した結果、30種類の候補を同定することができた。今後、これら候補蛋白の中でフェリクロームの抗腫瘍作用を仲介するものが同定されることで、新規標的分子としての意義が明らかになるものと期待される。

結 論

乳酸菌由来のフェリクロームが、その鉄結合部位を介して胃癌細胞にアポトーシスを誘導する作用を発揮する多機能分子であることを同定した。今後、胃癌細胞内の標的分子の同定と作用メカニズムを解明することで、新規抗腫瘍薬開発へと発展することが期待される。





引 用 文 献

1. Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, et al. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. PLoS ONE 2011;6:e23278.
2. Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, Hu S, Alverdy J, Kohgo Y, et al. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. Cell Host Microbe 2007;1:299-308.
3. Konishi H, Fujiya M, Tanaka H, Ueno N, Moriichi K, Sasajima J, et al. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. Nat Commun 2016;7:12365.

参 考 論 文

1. Ijiri M, Fujiya M, Ueno N, et al. Syphilis infection throughout the whole gastrointestinal tract. Endoscopy 2016;0;48(S 01):E338-E339.
2. Moriichi K, Fujiya M, Ijiri M, et al. Quantification of autofluorescence imaging can accurately and objectively assess the severity of ulcerative colitis. Int J Colorectal Dis 2015;30:1639-1643.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	井尻 学見
<p>審査委員長 西川 祐司 </p> <p>審査委員 谷口 隆信 </p> <p>審査委員 古川 博之 </p> <p>審査委員 大崎 能伸 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Ferrichrome identified from <i>Lactobacillus casei</i> ATCC334 induces apoptosis through its iron binding site in gastric cancer cells (胃癌細胞において、<i>Lactobacillus casei</i> ATCC334 から同定されたフェリクロームはその鉄結合部位を介してアポトーシスを引き起こす)</p> <p>プロバイオティクスは健康の維持に有効と考えられているが、まだその大きな可能性は十分に明らかにされていない。本論文において、申請者らは乳酸桿菌の産生するプロバイオティクスの1つであるフェリクロームを取り上げ、この物質の胃癌に対する抗腫瘍効果について検討している。</p> <p>各種胃癌細胞株の無血清培養系で、フェリクロームを添加すると、1-100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で有意な細胞数抑制効果が認められた。また、ヌードマウスの皮下に胃癌細胞を移植したモデルでも、100 $\mu\text{g/day}$ の投与量で、腫瘍の増大が抑制された。胃癌細胞株に対するフェリクロームの効果は主としてアポトーシスによる細胞死に基づいており、そのメカニズムに JNK/DDIT3 経路の活性化が関与していることを示唆する結果が得られた。</p> <p>フェリクロームは鉄結合タンパク質、シデロフォア的一种であり、細胞内鉄濃度を低下させたが、これ自体はアポトーシスの原因ではないと推定された。一方、鉄を結</p>			

合したフェリクロームはアポトーシス誘導能を失うことから、鉄結合部位がその生物学的作用に重要であることが示唆された。非鉄結合型フェリクロームと安定的に結合するタンパク質をデータベースで検索したところ、30個程度の候補が上がり、うち3つはアポトーシスに関連していた。申請者はこれらの結果から、フェリクロームが胃癌細胞において特異的タンパク質に結合してその機能に影響を与え、抗腫瘍効果を発揮している可能性を示した。

申請者のグループによる先行研究において、大腸癌でのフェリクロームの抗腫瘍効果が示されているが、胃癌でも効果があることは、フェリクロームの新規抗腫瘍薬としての広い適用の可能性を示唆するものである。今後、候補タンパク質とフェリクロームの相互作用や腫瘍特異性をより明確にし、プロバイオティクスとして発展させることが期待される。

委員の質問に対して、申請者は具体的かつ明快な説明を返し、十分な能力と知識を有していた。本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論文が博士論文として相応しいものであると判定した。