

氏名・本籍	杉原 由佳 (広島県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第34号
学位授与の日付	平成29年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	ラクトフェリンのDSS誘発潰瘍性大腸炎におけるDMH誘発大腸癌 に対する作用について
学位論文審査委員	主査 教授 達家 雅明 副査 名誉教授 嶋本 文雄 教授 小西 博昭 教授 肖 業貴

## 学位論文の要旨

第1章では、人の潰瘍性大腸炎関連大腸癌実験におけるウシラクトフェリン (bLF) の作用についての本研究の目的を述べている。

現在、潰瘍性大腸炎は原因不明の病気で患者は年々増加し、国の難病に指定されている。また、発症は若年層に多くみられ、一度発病してしまうと長期の治療が必要とされる。そのため身体への影響も多い。さらに、潰瘍性大腸炎を治療せず、そのままにしていると約10年で癌化するとも言われている。癌で死亡した割合を臓器別でみると、男女ともに大腸癌が急速に増加し、特に女性は大腸癌が一位となっている。潰瘍性大腸炎からなる大腸癌は、大腸に炎症が同じ部位に何度も起こり、それを何度も修復する過程でDNAが損傷することで癌が発生するといわれているが、潰瘍性大腸炎の発生と同様に詳しいメカニズムは分かっていない。

今回はbLFを使用し、潰瘍性大腸炎を誘発した大腸癌に対する作用について検討した。bLFは鉄トランスポーターファミリーに属し、鉄との結合作用だけでなく、多岐にわたる生物学的作用を有する多機能タンパク質である。母乳や唾液・涙・血漿・鼻汁・好中球に存在し、特にヒトの母乳、出産後数日の間に多く分泌される初乳に最も多く含まれ、乳児の健康維持のために必要な成分である。このように様々な外分泌液中に含まれているbLFは生体内で多彩な機能を発揮し、主に、抗炎症・抗菌・抗ウィルス・抗腫瘍・免疫調節・抗ストレス作用があり、bLFは生体を感染から守るのに重要な役割を果たしている。これらの機能を生かし、現在では癌や、歯周病、骨粗鬆症などの様々な予防効果の研究に用いられている。今回は潰瘍性大腸炎を背景にした大腸発癌について検討した。

第2章は、人の潰瘍性大腸炎に類似した炎症を引き起こすデキストラン硫酸ナトリウム (DSS)

と大腸癌を発症させる 1,2 ジメチルヒドラジン (DMH) を用いたモデルラットを使用し、bLF の抗腫瘍効果について述べている。DSS を 1 週間投与し、DMH を 1 週間に一度、計 8 回投与し潰瘍性大腸炎からなる発癌処置したラットに対して、濃度の異なる bLF を自由摂取させ bLF の効果を検討した。解剖時には開腹し、門脈血を採血し、血液を項目ごとに検査した。臓器は全て取り出し、肉眼的に観察し、計測した。さらに大腸を取り出し、8 等分に分割しそれをそれぞれ縦に 3 分割し、上行結腸側から 8 等分したうちの 2 つを近位結腸、中 2 つを結腸屈曲部、肛門側から 4 つを遠位結腸部とした。その後、10%ホルマリン溶液で固定後、実体顕微鏡で前癌病変の指標である異常陰窩巢(Aberrant crypt foci : ACF)を観察した後標本を作製し、光学顕微鏡で病理組織学的観察を行った。

その結果、癌の早期段階にみられやすい前癌病変 (ACF) の発生抑制効果が bLF 投与により示された。また、腺腫において、ラット 1 匹当たりの発生数、異型度の異なる軽度、中等度、高等度異型腺腫で検討した結果、bLF の長期間摂取による濃度依存的な発生抑制効果が示された。腺癌においても、ラット一匹あたりの発生数、組織学的に分類した分化型癌と未分化型癌で、ラット一匹あたりの発生数と分化型癌の発生数において bLF 摂取による早期段階からの発生抑制の可能性が示され、bLF の効果が示唆された。

第 3 章は、F344 ラットに DMH で発癌を誘発させた大腸癌細胞株 RCN-9 細胞を使用して第 2 章の *in vivo* で得られた結果の詳しいメカニズムの検討について述べている。まず初めに細胞増殖において bLF による RCN-9 細胞株抑制効果について評価した。次に、フローサイトメトリーで bLF における細胞周期の G1/S 期の抑制効果を検討した。次に、CyclinD1 の m-RNA 発現と、ウェスタンブロットによるタンパク質 (CyclinD1、p-21) の検出、bLF の受容体 LRP1 (LDL-receptor related protein 1) を阻害したときの bLF の作用について検討した。その結果、bLF による RCN-9 細胞の増殖抑制する効果が示された。細胞周期においては CyclinD1 発現抑制により細胞の分裂が止められ、細胞増殖を抑える効果が得られた。また、bLF は活性化されていない BCL2 や p 53 そして Cleave Caspase3 を誘導することによって細胞のアポトーシスを誘導した。これらは、bLF が ERK、AKT 経路を抑制することによりアポトーシスが誘導される。次に bLF の受容体 LRP1 について検討した結果、LRP1 をノックダウン (si-LRP1) し、先程と同様アポトーシスに関係するタンパク質発現を検討することで bLF は LRP1 で取り込まれ、作用していることが示唆された。

この結果から bLF は受容体 LRP1 で取り込まれ、細胞増殖因子である AKT、ERK を抑制させることにより、p53 の発現を上昇させた。さらに、アポトーシスを誘導する Caspase3 の発現が上昇し、アポトーシスが誘導されたと考えられる。

第 4 章では、本研究の総括を述べている。*in vivo* において bLF の前癌病変の抑制や腺腫、腺癌に対する抗腫瘍効果を示し、*in vitro* ではメカニズムについて検討した結果、bLF は細胞増殖を抑制し、アポトーシスの誘導、p53 の発現誘導の効果を示した。これらのことから bLF は潰瘍性大腸炎関連実験において大腸腫瘍抑制に効果があると考えられる。これらの結果は今後の人の潰瘍性大腸炎関連の大腸腫瘍研究にとっても有用な情報になると思われる。