

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

平成 28 年 12 月 20 日

県立広島大学 総合学術研究科
生命システム科学専攻（後期）

2016 年度 嶋本研究室

1331003 杉原 由佳

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

平成 29 年 3 月

(2017 年)

杉原由佳

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

県立広島大学大学院

総合学術研究科

生命システム科学専攻

博 士 論 文

平成 29 年 3 月

(2017 年)

杉原由佳

目次

第一章	諸言	4
第一節	潰瘍性大腸炎関連の大腸癌とラクトフェリンの作用と、本研究の背景と目的について	5
第一項	背景	5
第二項	Lactoferrin (LF) について	8
第三項	本研究の目的について	10
第二章	潰瘍性大腸炎関連大腸癌誘発モデルラットを用いた LbLF の抗腫瘍効果	11
第一節	はじめに	11
第二節	材料および方法	11
第一項	実験動物	11
第二項	飼料	11
第三項	動物実験スケジュール	15
第四項	大腸組織の組織学的評価	17
第五項	統計処理	18
第三節	結果	19
第一項	体重・摂餌量・飲水量の推移	19
第二項	臓器重量と血液検査の変化	21
第三項	肉眼的所見結果	22
第四項	実体顕微鏡による ACF の測定	24
第五項	病理組織学的観察	26
第六項	組織学的観察による腺腫数	30
第七項	腺腫の異型度による分類	32
第八項	組織学的観察による腺癌数	33
第九項	腺癌の組織学による分類	34
第四節	小括	35
第三章	大腸癌細胞株 (RCN-9) を用いた bLF による増殖抑制作用のメカニズム検討	36
第一節	はじめに	36
第二節	材料および方法	39
第一項	材料	39
第二項	bLF の大腸癌細胞増殖抑制の評価	39
第三項	CyclinD1 の m-RNA 発現の定量	39
第四項	ウェスタンブロットによるタンパク質の検出	40
第五項	LRP1 受容体を阻害したときの bLF の評価	41
第六項	統計処理	41
第三節	結果	42
第一項	bLF による大腸癌細胞株の成長抑制の検討	42

第二項	bLFによるアポトーシス誘導についての検討	45
第三項	LRP1により取り込まれた大腸癌細胞株のbLFの効果	47
第四項	bLFが細胞周期を抑制し、LRP1からp53を経由するアポトーシスの検討	50
第五項	AKTとERKを経由するbLFの抑制効果	52
第四節	小括	55
第四章	総括	58
参考文献		60
謝辞		64

[略語一覧]

ACF : aberrant crypt foci

BCL2 : b-cell leukemia/lymphoma 2 protein

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMH : 1,2-dimethyl hydrazine

DNA : deoxyribonucleic acid

DSS : Dextran Sulfate Sodium

DTT : dithiothreitol

FBS : Fetal Bovine Serum

HE 染色 : hematoxylin and eosin stain

LF : Lacto ferrin

LRP1 : LDL-receptor related protein 1

LbLF : Ribosome bovine LactoFerrin

NK 細胞 : natural killer cell

PBS(-) : phosphate buffered saline without Ca²⁺ and Mg²⁺

PCR : polymerase chain reaction

TUNEL : TdT-mediated dUTP nick end labeling

UC : Ulcerative Colitis

bLF : bovine LactoFerrin

c DNA : complementary DNA

第一章 諸言

第一節 潰瘍性大腸炎関連の大腸癌とラクトフェリンの作用と、本研究の背景と目的について

第一項 背景

現在、我が国の死因の第一位は悪性新生物であり、昭和 56 年から変わることなく今も増え続けており、平成 25 年の全死亡者に占める割合は 28.8% となっている。(1) これは全死亡者のおよそ 3.5 人に 1 人は悪性新生物で死亡していることになる。これらはこれからも増加していくことは明らかである。(1)

さらに悪性新生物を臓器の部位別で死亡数・死亡率をみると、大腸癌が急増し特に女性においては 1 位となっている。

大腸癌は特に食生活と深く関係しており、特に近年の欧米化により増加している。食の欧米化による原因として岡安らの研究によると、大腸癌の発癌経路には 3 つあり (2)、正常細胞から突然癌細胞となるタイプと、ほとんどの大腸癌がなる腺腫から腺癌が生じるタイプと、潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis:UC) からなる大腸癌のタイプの 3 つが挙げられる。特に潰瘍性大腸炎は年々増加しており、大腸癌へのリスクが増加している。

潰瘍性大腸炎は平成 25 年度では 166,060 人が患者として登録されており、現在原因不明の疾病である。(figure1-1) 患者の多くは若年層、特に 20 代から 30 代に発症が多くみられ、10 代からの発症も少なくない。極めて重症の例を除くと、大腸の粘膜と粘膜下層に炎症を侵す潰瘍性炎症性疾患であり、血便・粘血便・下痢・腹痛などの症状がみられる。再燃と緩解を繰り返し、国の難病に指定されている。一度発病してしまうと長期の治療が必要となり、大腸癌へのリスクが高くなる。(3) 潰瘍性大腸炎に罹患して 10 年で大腸癌

になるといわれ、10年で3~5%、20年で25%ともいわれている。(4・6)

潰瘍性大腸炎からなる大腸癌の原因ははっきり解明されておらず、不十分である。現在考えられている原因として岡安等は炎症が慢性的に起きているところでは細胞が分裂する回数が増えその分裂の際にDNAが複製される際に変異が起こりやすく、炎症が慢性的にある潰瘍性大腸炎患者においてはこのDNAの複製頻度は高くなり、その結果DNAの変異の生じるリスクが高くなるためだといわれている。

潰瘍性大腸炎は原因不明ではあるが、本来欧米や西洋に多い疾病で、日本も食の欧米化に伴い罹患者は増加しており、食生活においても重要な役割を果たすと考えられる。

潰瘍性大腸炎からなる大腸癌においても、これから予防・治療していくことを可能にしていくことがこれから求められてくることの一つであると言える。

第二項 Lactoferrin (LF) について

LF は 1939 年にデンマークのゼーレンセン博士により、牛乳の中から赤い色をしたタンパク質として発見された。分子内に 2-3 個のシアル酸からなる糖鎖を保有する糖で構造は 700 以上のアミノ酸が結合した一本鎖のポリペプチドで、ほぼ同じ数のアミノ酸からなる C 末端と N 末端はジスフィルド結合で球状に丸くなり、二つの球体が結合したような構造をしている。(7)

その後の研究から、鉄を結合する性質を持っていることが分かり、ラクト(乳)とフェリン(鉄と結合するタンパク質)をつなげて、ラクトフェリンと名前が付けられた。その後、1960 年にヒトとウシの乳より精製され、アミノ酸配列が決定された。

鉄トランスポートファミリーに属し、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ているおり、乳児の健康維持のために必要な成分であるとされている。このように様々な外分泌液中に含まれている LF は生体内で多彩な機能を発揮していると推定されるが、主な作用として、抗炎症・抗菌・抗ウイルス・抗腫瘍・免疫調節・抗ストレス作用がある。これらの作用により基づき LF は生体を感染から守るのに重要な役割を果たしていると考えられる。

そのため現在ではこれらの効能を生かし、体脂肪を減少させるサプリメントや、歯周病、高コレステロール血症、関節炎に対するものまで様々な領域で LF は研究されている。このような作用のある LF 通常の状態では胃で消化されやすく、ほとんど機能を発揮していないとされている。乳児の健康維持に必要とされているのは、乳児は消化器官が未発達なため、LF が消化されずに体内で機能を発揮している。

他の成分と大きく異なることは多量摂取しても副作用がないといわれているためでもあり、大腸癌に効果が期待できるものとして高不飽和脂肪酸や、カロチノイド、カテキン、ポリフェノールなどが、癌予防に効果があることが研究によって知られている。しかし、これらは発がん予防有効量を超えると毒性があるということもわかっており、そのため人の臨床実験まで至っていない。また、研究によってLFは発癌予防として、血管新生阻害 アポトーシス誘導 免疫賦活 抗炎症 発癌物質の活性化阻止これらの作用が重なり発癌予防に効果があるといわれておりこれらが大腸癌に有効であるといわれている。LFの癌抑制効果は *in vitro* で示されており(8)、その役割として Caspase-3 を誘導しアポトーシスを誘導するためだと考えられている。

第三項 本研究の目的について

潰瘍性大腸炎は、原因不明の疾患のため、完治治療はなく、緩和治療が行われている。また、長期の治療を必要とするため、心身への影響も多い。そこで副作用の無い LF を今回用いた。大腸癌に関わらず、膀胱・胃・食道などに出來た癌に LF が有効であるという研究は行われている。(9-10) それには津田等が LF の効果として 1、小腸上皮におけるインターロイキン-18 とカスパーゼの誘導 2、小腸上皮固有層における NK 細胞、CD8+、CD4+、インターフェロン γ 産生 T 細胞の誘導 3、発がん性ヘテロサイクリックアミンを活性化化する CYP1A2 誘導の阻害 4、Fas とカスパーゼ-8、カスパーゼ-3 の活性化による発癌剤誘導腸上皮のアポトーシス誘導 5、癌の血管新生阻害 が関係していると言われている。

そこで本実験では DSS と DMH を一緒に使用することにより潰瘍性大腸炎から大腸癌を引き起こすモデルを使用し、これらのラットに LF を投与することにより、4、のアポトーシスに着目し、潰瘍性大腸炎からなる大腸癌の抗腫瘍効果を検討し、LF と潰瘍性大腸炎からなる大腸癌との詳しいメカニズムを解明することを目的としている。

第二章 潰瘍性大腸炎関連大腸癌誘発モデルラットを用いた LbLF の抗腫瘍効果

第一節 はじめに

第二節 材料および方法

第一項 実験動物

動物 4 週齢雄 F344 (SPF/VAF) ラット (日本チャールスリバー株式会社) 36 匹を 12 匹ずつに分け、1 週間の予備飼育を行った後実験に用いた。本実験は、県立広島大学研究倫理委員会の承認を得たものである。

第二項 飼料

本実験では予備飼育後 control 群、LF×1 群 (500mg/kg/day)、LF×2 群 (1000mg/kg/day) の 3 群に分けた。Control 群、LF×1 群、LF×2 群は同じ餌を与え、餌は実験動物用固形基礎飼料 MF (オリエンタル酵母) を使用した。飲水をそれぞれ変えた。飲水は Control 群には空リポソームを与え、LF×1 群、×2 群にはそれぞれ決められた濃度の LF が与えた。

(Figure 2-1)

LF の濃度は先行研究により算出し、1 倍 (500mg/kg/day) を LF×1 群、2 倍の濃度 (1000mg/kg/day) の LF を与えたものを LF×2 群とした。ラクトフェリンは Ishikado らの方法により作成された SLF (サンスター、大阪) を使用した。(9)

ラクトフェリン

Ishikado らの方法により作成された SLF (サンスター、大阪) を使用した。(9)

た。(9)

前週の飲水より、ラクトフェリン摂取量が 1000mg/kg/day になるように SLF 原液を調整し、ラットに与えた。ラクトフェリンが配合されていないもの (SPC、Control) に関しても条件をそろえるために、同じように調整した。

LF の原液調整に使用した計算式

Y g のラットが 1 日 Zcc の飲水をする場合の原液の量 Xml

$$X = (2.083 \times Y) / Z$$

この計算式で求めた Xml の原液に蒸留水を加え、500ml になるように調整を行った。

Dextran Sulfate Sodium(DSS)

DSS はムコ多糖の一種で水に溶けやすく、エタノール及びアセトンにほとんど溶けない粉末で、無水・D-ブドウ糖 (α -1,6-グルコシド結合) 部と硫酸基からなるヘパリンのような多糖類である。DSS を飲水させたラットは潰瘍性大腸炎を誘発し、大腸が委縮するだけでなく、炎症並びに固有構造の消失が直腸から始まって肛門まで起こり、体重減少、さらには衰弱死に至ることもあるということが示唆されている。(9) また、大腸炎の発達は、投薬の適用量と継続に加えて、DSS の分子量と硫酸化に依存している。(9) DSS は胃で脱重合されるが、胃や小腸では炎症を誘発することはなく、腸管空に吸収される時点で炎症を引き起こすといわれている。(9) また、Watt らは硫酸多糖類が多く陰イオンの状態で大腸腔内に存在するため、これらの硫酸多糖類の強力な負の電気的状態が大腸粘膜の防御機能を妨げること

により潰瘍を形成するとも推測している。腸内細菌叢の変化、サイトカインの関与、免疫担当細胞の動態らの関与も報告されており（9）、最近では好中球が産生する活性酸素が関与している報告もある。このように粘膜バリア障害の結果、DSS は粘膜下層に達し抗原提示細胞に貪食される。このことにより、活性化した抗原提示細胞が T 細胞活性化を引き起こし、炎症性腸疾患と類似した症状を引き起こすため、動物実験で用いられてきた。

1,2-dimethylhydrazine (DMH) (Figure2-1A,B)

DMH は肝臓で代謝され、AOM から MAM さらに発癌性物質メチルジアゾニウムイオンを生じる。メチルジアゾニウムイオンはグアニンの6番目の酸素をメチル化する。これを DNA のメチル化という。（10）（11）

DNA をメチル化することによって DNA 損傷を起こす。DNA メチル化によって ACF を生成する。ACF は癌初期段階の指標となる。異型性のものが増殖すると癌になる。

また、DMH は安定な物質で取扱いが容易で、ラットやマウスに皮下投与により極めて高率にしかも特異的に大腸癌が発生すること、発生した大腸癌が組織学的にヒト大腸癌に類似していることなどの特徴があり、胆汁酸、食餌内容、腸内細菌などの発癌におよぼす因子の解析や大腸癌治療のモデルとして利用されている。DMH 発癌はヒト大腸癌と同様に大腸に高率に発生するが、小腸にはほとんど発生しないものを用いた。（12）

(A)

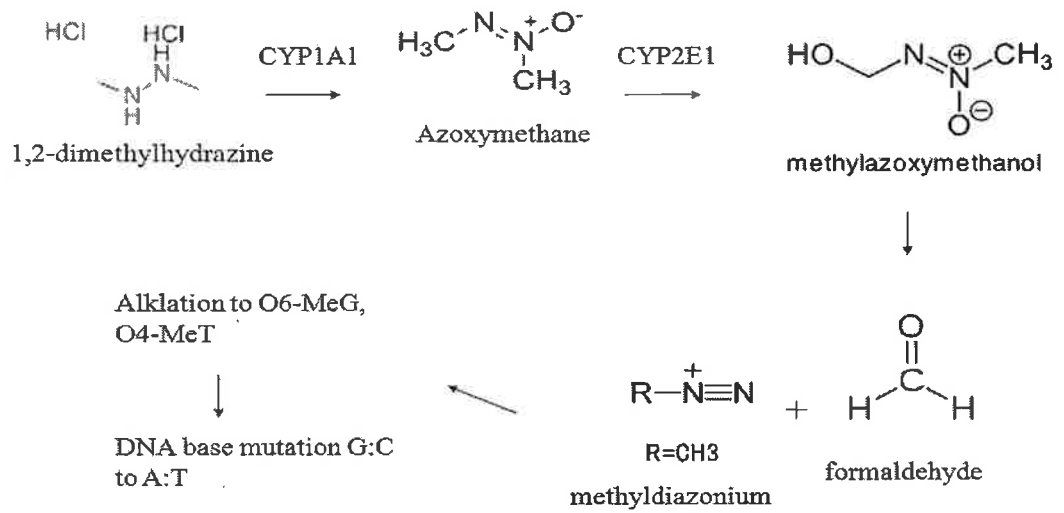


Figure2-1 Scheme of DMH metabolism.

(B)

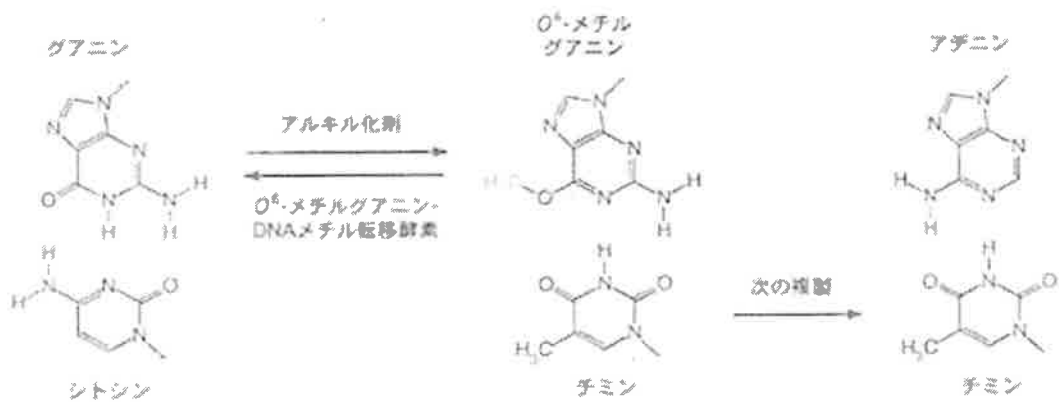


Figure2-1 Scheme of DMH-induced DNA mutation

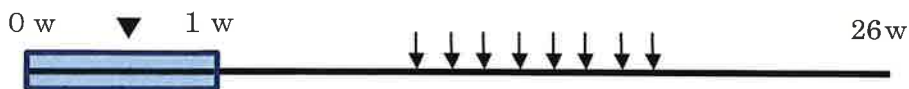
第三項 動物実験スケジュール

実験開始の1週間は大腸炎誘発物質の1%DSS (Dextran Sulfate Sodium) 溶液を飲水させたのち、control 群には空リポソーム、LF×1群、LF×2群には各濃度のLFを飲水させ、発癌物質のDMH(DMH:1,2 - dimethylhydrazine) 20mg/kgを週1回計8回投与した。摂餌は普通食を自由摂餌させた。餌の栄養素は (Table2-2) に示した。実験開始後26週目にエーテル麻酔下で血液を採血後屠殺し、体重および主要臓器 (肝臓・腎臓・胸腺)、脂肪組織重量を測定し、大腸の肉眼的観察を行った。大腸は上行結腸側を①、肛門側を⑧として、8等分に分割しさらにそれぞれ縦に3分割し、①から②を近位結腸、③から④を結腸屈曲部、⑤から⑧を遠位結腸とした (Figure2-3)。1標本作製した。10%ホルマリン溶液で固定後、実体顕微鏡でACFを観察した後標本作製し、光学顕微鏡で病理組織学的観察を行った。(Figure2-2)

県立広島大学動物飼育規定に基づき、室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $70 \pm 10\%$ 、12時間の明暗サイクルで行った。

Table2-1 Nutritional list of ingredients

Nutrient	The content/100 g
Protein	23.6
Fat matter	5.3
Carbohydrates	54.4
total calorie	360Kcal



Group	n	DSS1%	DMH (20mg/kg)	MF
control	12	+	+	+
LF × 1 (500mg/kg/day)	12	+	+	+
LF × 2 (1000mg/kg/day)	12	+	+	+

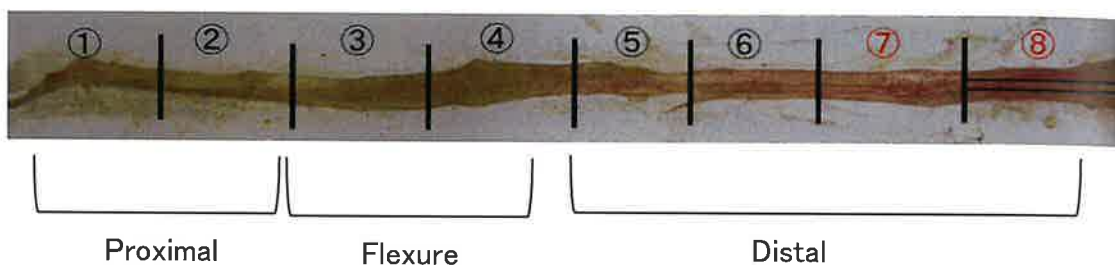


Figure2-3 F 344♂, 4wks ▼ DSS1% in drinking for 7 days old. ↓ DMH injection once week for 8wk (20mg/kg) The one which increased in LF was water as there was no difference, and it was controlled.

Table2-2 Nutritional list of ingredients of drinking water

		配合% (w/w)			
		大豆レシチン	ラクトフェリン	グリセリン	水
SPC-LLF	リポソーム化	4.0	12.0	35.3	48.7
LF					
SPC	空リポソーム	4.0	0.0	35.3	60.7

第四項 大腸組織の組織学的評価

ラット解剖時に速やかに摘出した大腸を縦方向に切開し、大腸粘膜に発生した肉眼的に観察できる腫瘍について大きさ、形状、発生部位を記録した。大腸は 10%中性緩衝ホルマリン液（060-01667：和光純薬工業、大阪）で 24 時間程度固定した。

異常腺窩巣（aberrant crypt foci :ACF）測定

24 時間程度ホルマリン固定した大腸を水道水で洗浄後、0.2%メチレンブルー液で 5 分間染色し、水に浸漬した状態で実体顕微鏡を用いて、大腸全体の表面に観察される ACF 数および、集合した異常腺窩（aberrant crypt:AC）数を計測した。

組織学的観察

ACF 測定後の大腸を 8 等分し、さらに縦軸方向に 3 等分に分割し、それぞれカセットに入れて、パラフィン包埋標本ブロックを作製した。その後、マイクロームで 4 μ m に薄切した組織切片でヘマトキシリン・エオジン（HE）染色標本を作製した。病理組織学的観察は、大腸癌取扱い規約（第 8 版；金原出版株式会社）（64）に則り、腺腫・腺癌に分類した。腺腫の分化度として、高分化型管状腺癌、中分化型管状腺癌、低分化型管状腺癌、粘液癌、印鑑細胞癌に分類した。さらに腺癌の進達度として、粘膜内（M）、粘膜下層（SM）、固有筋層内（MP）、漿膜表面には露出していない（SS）漿膜を超えて腫瘍が露出している（SE）大腸の壁を越えて周囲の組織に浸潤しているもの（Si）に分類した。

また、大腸は Rosengren ら（1997）の報告を参考に 8 等分した盲腸側か

ら2つ分を近位結腸 (proximal)、続いて2つ分を結腸屈曲部 (flexure)、残りの4つ分を遠位結腸 (distal) に分けた。

HE 染色による評価

大腸のパラフィン包埋切片 (4 μ m) は1日乾燥させたものを使用する。それをキシレンで脱パラフィン後、3%過酸化水素/エタノール (MeOH) で30分浸漬させ内因性ペルオキシダーゼを失活させた。100、90、70%エタノール (EtOH)、水道水、PBS に各5分ずつ浸漬させ、マイヤーヘマトキシレン液 (サクラファインテックジャパン株式会社、東京) に2分間核染色した。流水下の水道水で5分洗浄し、エオジン (サクラファインテックジャパン株式会社) で5分間、細胞質・間質の染色をした。水道水で1秒間洗浄し、3分間ずつ70、90、100、100%EtOHで脱水処理を行い、キシレンで3回浸漬させたのち、封入を行った。

第五項 統計処理

有意差検定には unpaired two-tailed Student's t-tests を使用した。P値が0.05未満のとき有意差ありと判断した。

第三節 結果

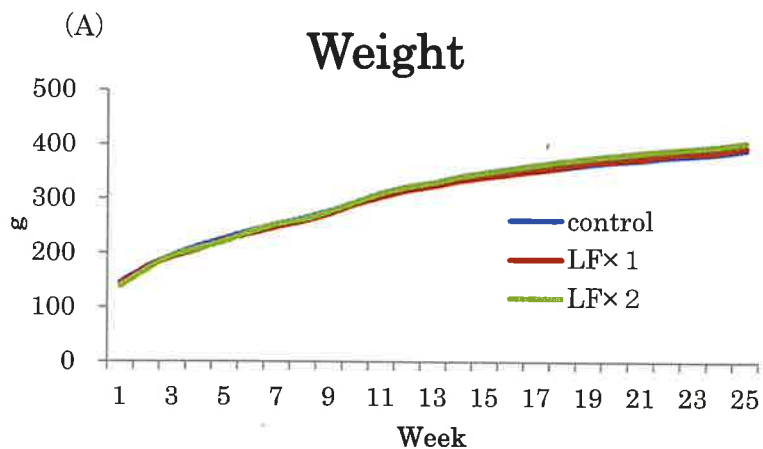
第一項 体重・摂餌量・飲水量の推移

ラットの体重・摂餌量・飲水量を計測することにより、健康状態を把握することが出来、また重要な指標となる。Table2-3 に解剖時までの平均体重・摂餌量・飲水量を示した。Figure2-4 には実験期間中の体重 (A)・摂餌量 (B)・飲水量 (C) の推移を示した。

結果、体重・摂餌量・飲水量いずれも実験中、解剖時においても3群間に差は見られなかった。

Table 2-3 The average weight, the average feeding amount and average amount of drinking

Group	Body weight at 25week(g)	Food intake (g/day/rat)	Drink water (ml/day/rat)
control	302.9±71.6	12.7±1.0	544.2±4.0
LF×1	302.6±74.1	12.5±1.0	555.9±2.7
LF×2	308.2±78.2	11.8±1.0	520±3.6



(A) Rat/week average feeding amount. The amount a rat ate in a week was measured, and a mean indicated

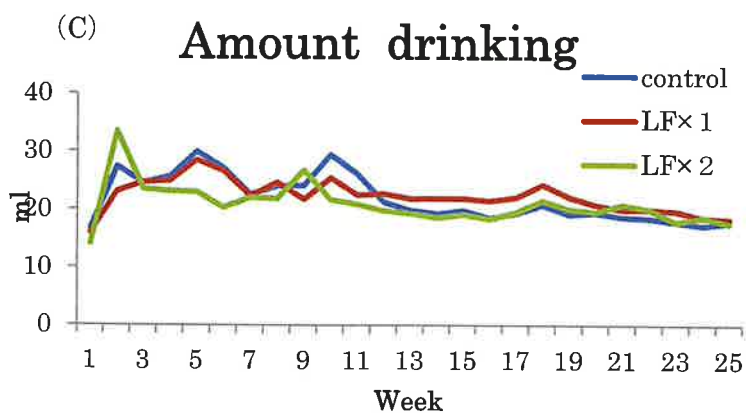
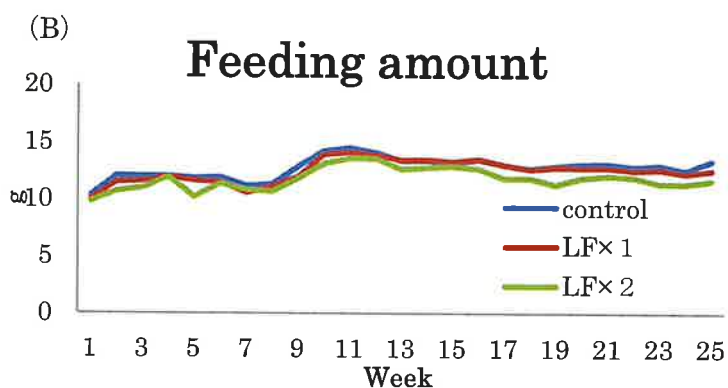


Figure2-4 (A) The average weight (B) The average feeding amount (C) The average

第二項 臓器重量と血液検査の変化

解剖時に全ラットの心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、睪丸、精巣上体脂肪組織の重量を計測した。しかし、3群間に差はみられなかった。

(Table2-4(A))

さらに、門脈から採血したものを検査した。こちらも3群間に差は見られなかった。(Table2-4(B))

Table 2-4(A) The weight of the organ

Group	n	Heart	Lung	Liver	Spleen	Pancreas	Kidney	Testicle	Epididymal adipose tissue
Control	12	1.04± 0.05	1.56± 0.05	11.65± 0.48	0.71± 0.04	0.78± 0.05	0.96± 0.03	1.64± 0.02	8.75± 0.76
LbLF 500mg/kg/day	12	1.00± 0.01	1.53± 0.03	10.72± 0.55	0.70± 0.03	0.77± 0.03	1.01± 0.05	1.66± 0.03	7.38± 0.55
LbLF 1000mg/kg/day	12	1.02± 0.03	1.55± 0.04	10.70± 0.40	0.68± 0.02	0.78± 0.06	1.00± 0.02	1.65± 0.04	8.94± 0.48

Table 2-4(B) Blood test

Group	n	WBC	RBC	HGB	HCT	TP	TTT	ZTT	T-cho
Control	12	47.5± 3.4	829± 99.8	13.6± 1.8	40.6± 4.6	6.37± 0.42	0.98± 0.14	0.54± 0.12	63.3± 4.66
LbLF 500mg/kg/day	12	50.4± 12.7	855.2± 58.8	14.0± 1.1	41.8± 2.5	6.61± 0.35	0.85± 0.17	0.38± 0.10	66.8± 9.65
LbLF 1000mg/kg/day	12	51.7± 13.6	854.9± 58.6	14.1± 0.8	42.2± 1.7	6.63± 0.39	1.00± 0.21	0.49± 0.10	60.9± 4.17

第三項 肉眼的所見結果 (Figure2-5)

各群 12 匹中 Control 群では 15 個の腫瘍、LF×1 群では 7 個、LF×2 群では 6 個の腫瘍が出来ていた。Control と比較して LF×2 群では有意に減少した (Table2-5)。ラット一匹当たりの腫瘍の大きさでは、control 群 4.91 mm、LF×1 群では 2.41 mm、LF×2 群では 1.79 mm と濃度依存的に減少し、control 群と比較して、LF×2 群では有意に減少した (Figure2-6)。よって LF×2 により腫瘍の数と大きさは有意に減少させることが出来た。

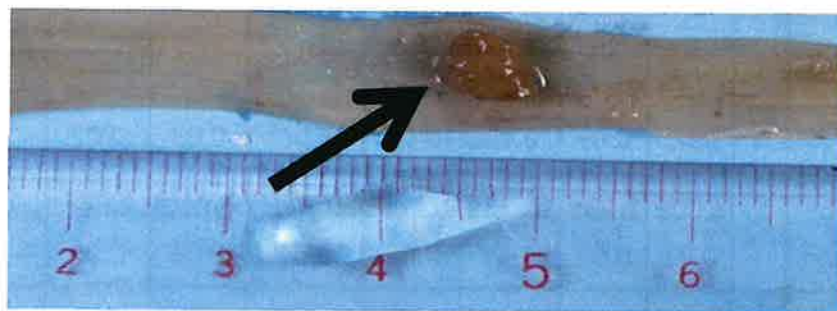


Figure2-5 The one indicated by an arrow is the tumor which could be made large intestines.

Table2-5 The number of generation of the tumor and the size

Group	n	Tumor	Rat/Tumor	Rat/size of the tumor
Control	12	15	1.25±0.62	4.91±3.57
LbLF×1	12	7	0.58±0.67	2.41±3.24
LbLF×2	12	6	0.5±0.45	1.79±3.26

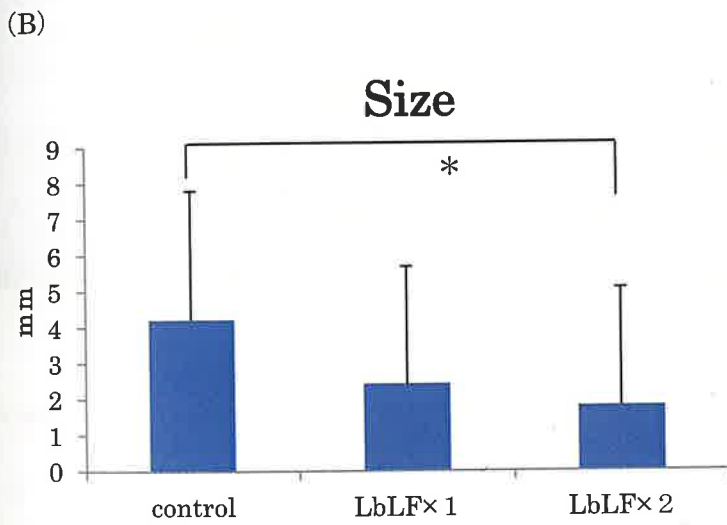
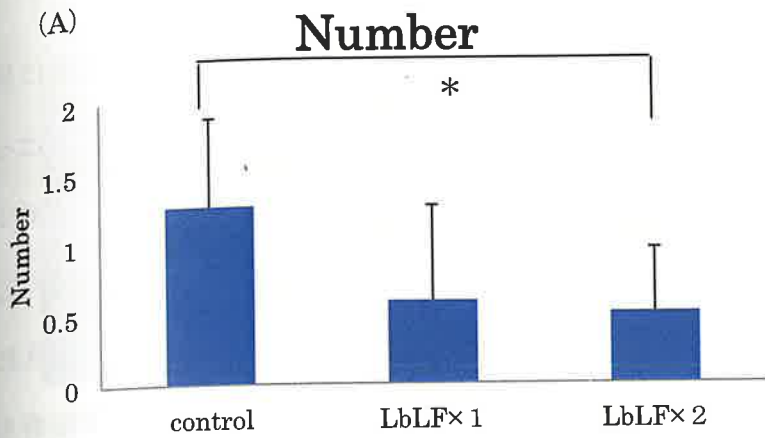


Figure2-6 (A) Rat/Tumor (B)Rat/size of the tumor. * $p < 0.05$

第四項 実体顕微鏡による ACF の測定

ACF は異常陰窩巢(Aberrant crypt foci : ACF)とは、肉眼的には正常に見える大腸粘膜で、組織学的には異型を示す腺管が集まり、周囲の腺管とはっきり区別できる病変を形成しているものである。また、小さな AC の数が少ないものより、AC の数が多いもののほうが悪性度が高いといわれている。ACF が必ずしも癌になるわけではないが、発がんマーカーとして利用されている。また、癌患者において健常者と比較して ACF が多いという報告もある。

前癌病変の指標である ACF の検討を行った。ACF をルーペで観察した結果 control 群では多数みられ (Figure2-7(A))、LF×1 群 (Figure2-7 (B))、LF×2 群 (Figure2-7(C)) と LF の濃度が高くなるにつれ、ACF の数は減少し control と比較して LF×1 群と LF×2 群で有意な差がみられた。

拡大図は (Figure2-7(D)) に示した。

DMH によって control は癌化が起きようとしているが、LF を投与することにより、ACF の数は減少し、さらに LF の濃度によっても ACF を減少させる効果がみられた。

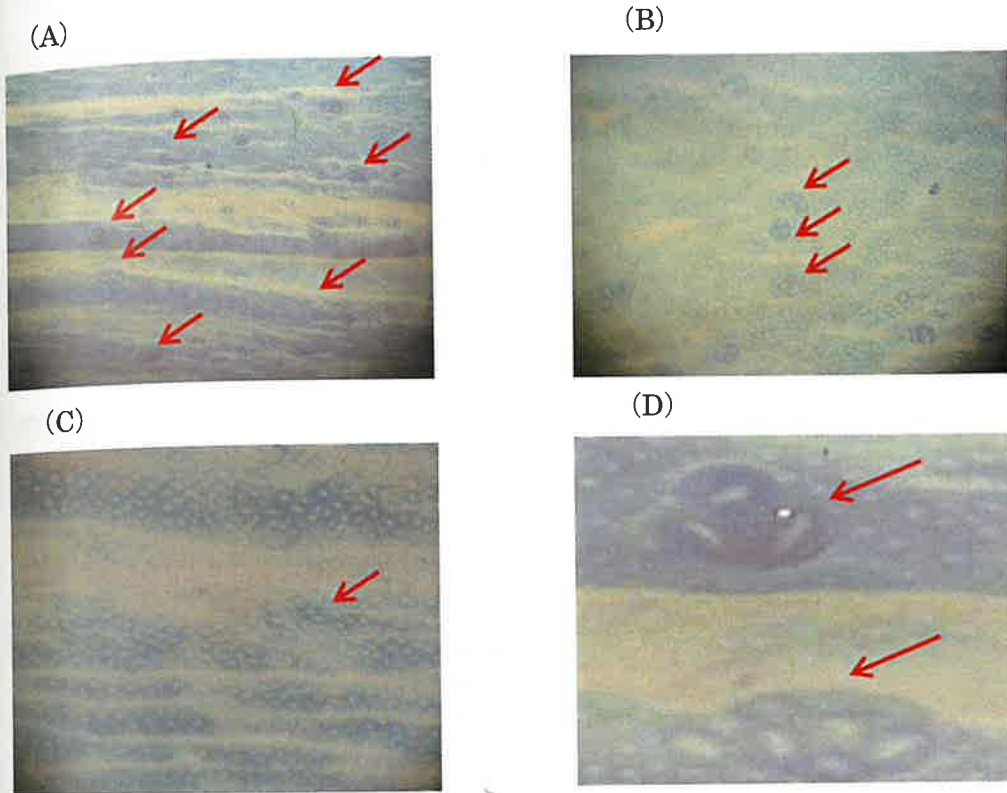


Figure2-7 (A) control (B) LbLF×1 (C) LbLF×2 (D) Enlarged drawing

Table2-6 Number of ACF/rat

	n	Number of ACF/rat
control	12	352.9±94.3
LbLF×1	12	236.6±57.5
LbLF×2	12	215.1±54.2

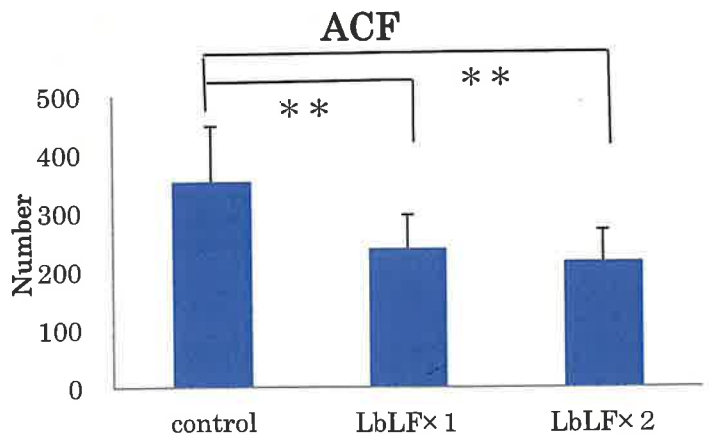


Figure2-8 Number of ACF * p < 0.05 ** p < 0.01

第五項 病理組織学的観察

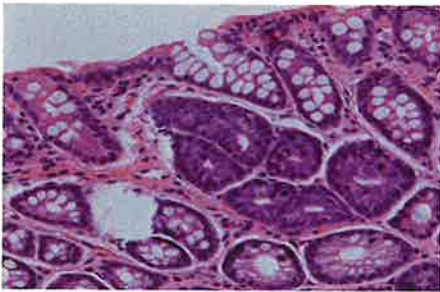
(A)



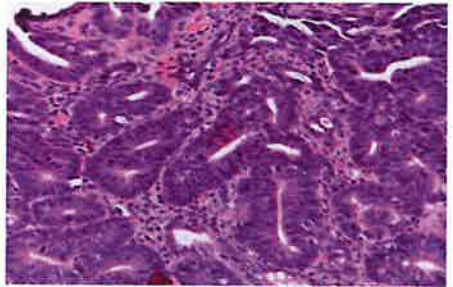
(B)



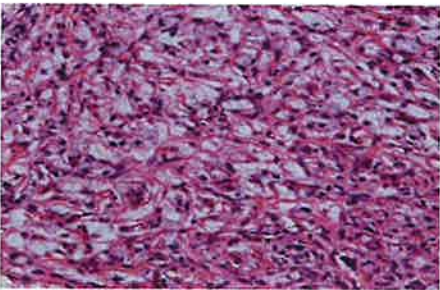
(C)



(D)



(E)



(F)

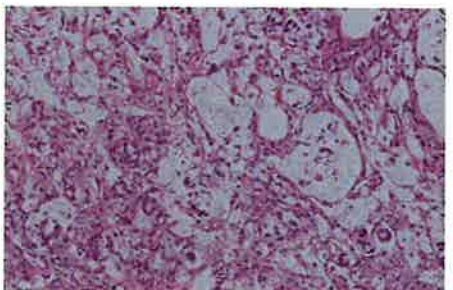


Figure2-9 (A) Adenoma with mild atypia (B) Adenoma with moderate atypia (C) Adenoma with severe atypia (D) well differentiated tubular adenocarcinomas (E) Signet ring cell carcinoma (F) Mucinous adenocarcinoma

組織学的観察において腺腫と癌に分けられ、腺腫は良性の腫瘍であり、異型度の違いにより mild atypia (軽度異型腺腫) moderate atypia(中等度異形腺腫) severe atypia(高度異型腺腫)にわけることが出来る。(13q)
腺腫は粘膜の腺上皮が増殖することにより発生する病変で、最初は異型も 軽

く、癌といえるものではないが、年数を重ねることにより、異型が少しずつ強くなり、癌となる。

軽度異型腺腫は正常の大腸腺管構造に近似しており、単一管状腺の形態をしているが、腫瘍腺管の密在性がより高まり、枝分かれした増生がより目立つようになるにつれて、異型度が高まると認識されている。腫瘍核が紡錘形ないし楕円形で、おおむね腺管基底側に位置し、細胞異型も軽度で、低異型度腺腫とされる。

中等度異型腺腫は軽度異型腺腫と比較して更に腺管がいびつになり、核が胞体の半分程度まで細長く変形し、大小不同が見られ重畳化した病変である。高度異型腺腫は細胞異型のやや高い腫瘍腺管が高密度にみられるもので、通常の管状腺腫と比べると、腫瘍核は楕円形・立方形主体で、核が重なる傾向を有し、核/細胞質比率も高く、胞体の表面にまで伸びているため癌との近似性が高まっている状態を高異型度腺腫とする。しかし、核の極性は保存されているため、腺腫の範囲内とみなす病変である。

腺癌とは上皮細胞が腺をつくる場所で、線上皮から発生する腺が腺癌(adenoma)である。腺癌は悪性の腫瘍であり、悪性腫瘍の細胞が強い異型を示す理由としておもに細胞の分化が妨げられてしまうことによる。正常の場合細胞が特定の機能をいとなんで、特定の形をしているが、腫瘍、特に悪性度が高くなると細胞の分化が低くなっており、正常の細胞とはかけはなれた形を呈している。

分化度の違いにより分類され、未分化型癌と分化型癌に分類できる。未分化型癌には低分化癌(Poorly differentiated adenocarcinoma;por)、粘液癌(Mucinous carcinoma;muc)、印鑑細胞癌(Signet-ring cell carcinoma;sig)があり、分化型は高分化癌(Well differentiated tubular

adenomarcinoma;wel)、中分化癌(Moderately differentiated tubular adenocarcinoma;mod)に分けられる。

未分化型癌は扁平上皮癌か腺癌か特定できない癌のもので、分化の性質を持たず、どの細胞から発生したか確認できないものである。

分化型癌腺管形成の明らかな癌で、進行大腸癌の大部分を占める。明瞭で大きいものまたは分岐・癒合が目立たない管状構造を呈するものは高分化に分類され、腺管癒合・腺管内腺管構造・篩状構造を呈するものや、中型～小型管状構造からなるものは中分化とされる。しかし、両者の厳密な区別が困難なものも少なくない。

また、組織学的深達度は早期癌と進行がん分類され、早期がん(early carcinoma)とは、上皮内癌を含めて、その段階で取り除けば再発はせず、完全な治癒が期待できるものである。また、早期がんとして腫瘍が粘膜内に留まっているものが M、粘膜下層に留まるものが SM に分類される。

また、早期がんには表在型 (0 型) があり、そのなかで、ポリープのように盛り上がった隆起型と、隆起が目立たない表面型の 2 つに大別される。進行癌は早期癌と真逆の意味であり、腫瘤型、潰瘍限局型、潰瘍浸潤型、びまん浸潤型に分類される。腫瘤型は盛り上がるようにがんが大きくなるもので、がん部位と正常組織の境界がはっきりしている。進行癌として固有筋層内に留まるものを MP、筋層を超えるが漿膜表面には露出していないもの SS、筋層を超えるが漿膜を超えて腫瘍が露出しているもの SE、大腸の壁を越えて周囲の組織に浸潤しているもの Si に分類される。

今回の実験結果で代表的な組織像として、図に示すように腺腫は、Figure2-9 (A) から軽度異型腺腫・(B) 中等度異形腺腫・(C) 高度異型腺

腫がみられ、癌は (D) 高分化癌・(E) 印鑑細胞癌・(F) 粘液癌がみられた。

また、分化型の高分化、分化型と比較して悪性度の高い印鑑細胞癌・粘液癌がみられた。

第六項 組織学的観察による腺腫数

悪性度は高くはないが、放置すると癌になりうる腺腫について検討した。各群腺腫の合計発生数は 12 匹中、control 群では 410 個、LF×1 群では 283 個、LF×2 群では 203 個の腺腫が発生した (Table2-7)。一匹あたりにすると control 群で 33.7 個 LF×1 群で 23.6 個、LF×2 群で 17.1 個で LF の濃度依存的に減少傾向がみられた。また、control と比較して LF×1 群と LF×2 群で有意な差がみられた (Figure 2-10(A))。

さらに腺腫が特に発生しやすい遠位結腸での腺腫発生数の検討を行った結果、control 群で 28.3 個、LF×1 群で 20.67 個、LF×2 群で 14.33 個の腺腫が発生し、減少傾向がみられた。Control 群と比較して LF×2 群では有意に減少した (Figure 12-10(B))。

Table2-7 Number of adenoma

Group	n	The number of the adenoma	Per 1 rat.	
			The number of the adenoma	Distal
control	12	410	33.7±12.91	28.83±12.5
LbLF×1	12	283	23.6±7.86	23.6±7.86
LbLF×2	12	203	17.1±5.81	17.1±5.81

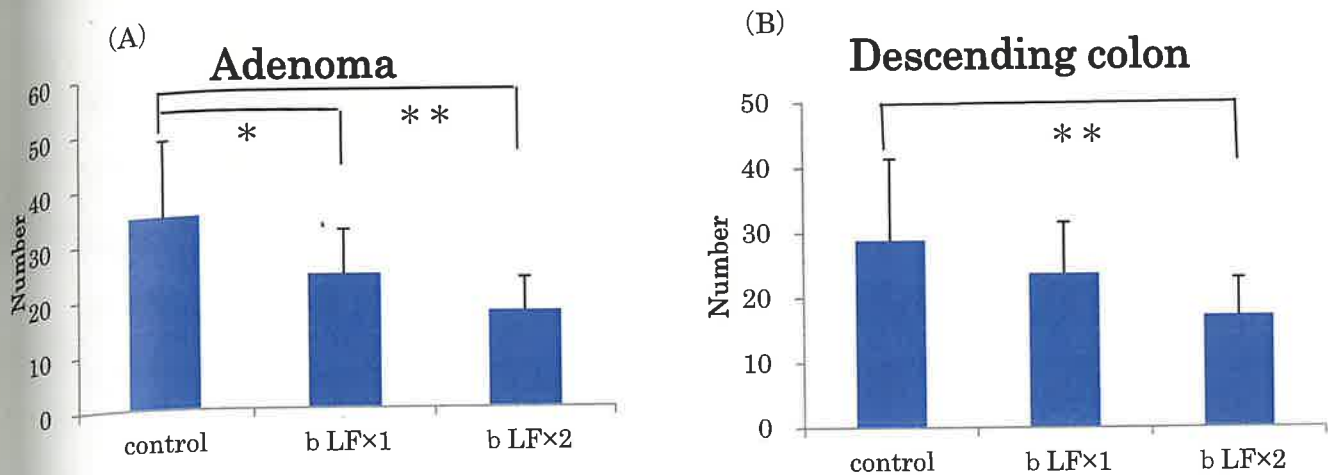


Figure2-10 (A) Number of Adenoma (B) Number of Descending colon

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

第七項 腺腫の異型度による分類

腺腫を軽度異型腺腫・中等度異形腺腫・高等度異形腺腫で検討をおこなった (Table2-8)。腺腫の異型度別でも同様に濃度依存的に減少傾向がみられ、軽度異型腺腫で control と比較して LF×2 群で有意に減少した (Figure 2-11(A))。中等度異形腺腫で control と比較して LF×1 群、LF×2 群で有意に減少した (Figure 2-11(B))。高度異型腺腫で control と比較して LF×1 群で有意に減少した (Figure 2-11(C))。

Table2-8 The classification chosen according to the degree of heteromorph of the

Group	Mild (Rat/Adenoma)	Moderate (Rat/Adenoma)	Severe (Rat/Adenoma)
control	279 (23.2±10.86)	112 (9.3±3.14)	19 (1.6±1.58)
LbLF×1	205 (17.1±5.01)	67 (5.6±3.18)	11 (0.9±1.44)
LbLF×2	157 (13.3±5.20)	43 (3.6±2.23)	3 (0.25±0.45)

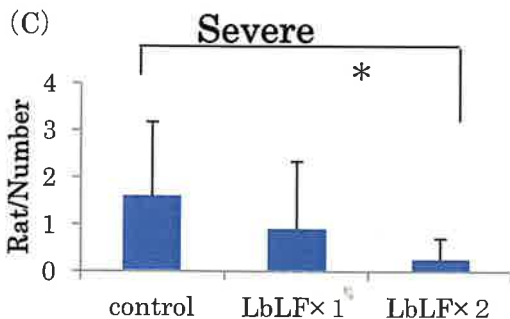
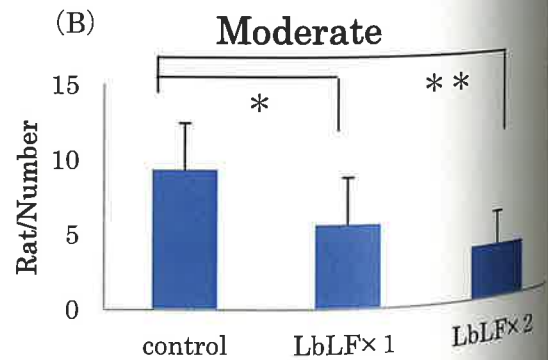
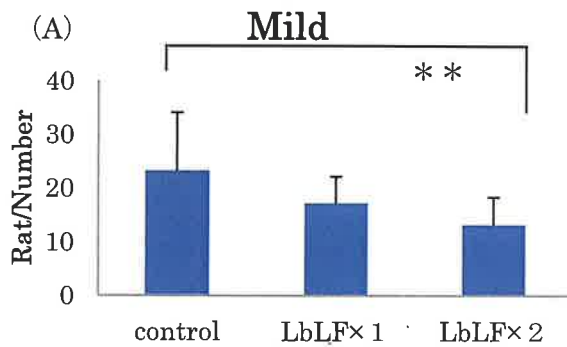


Figure2-11 (A) Rat/Number of Mild adenoma (B) Rat/Number of Moderate adenoma (C) Rat/Number of Severe adenoma * p < 0.05 ** p < 0.01

第八項 組織学的観察による腺癌数

腺癌数では control 群で 12 匹中 15 個、LF×1 群では 12 匹中 8 個、LbLF×2 群では 12 匹中 6 個の腫瘍が認められた (Table2-9)。一匹当たりの腺癌発生数では control と比較して LbLF×1 群、LbLF×2 群で有意に減少した。

(Figure2-12) また、腺癌を発生したラットも control 群で 11 匹、LF×1 群で 7 匹、LF×2 群で 5 匹となり、発生匹数も減少した。(Table2-9)

Table2-9 The adenocarcinomata

Group	n	Rat number	Adenocarcinoma number	Rat/number of adenocarcinoma
control	12	11	15	1.25±0.62
LbLF×1	12	7	8	0.67±0.65
LbLF×2	12	5	6	0.5±0.67

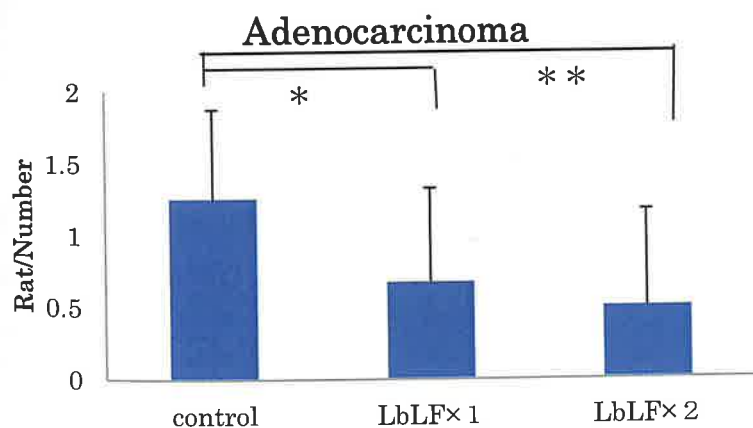


Figure 2-12 Rat/Adenocarcinoma. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

第九項 腺癌の組織学による分類

腺癌を組織学的に分類した。腺癌の中で分化型癌と比較して悪性度の高い印鑑細胞癌や粘液癌などの未分化型癌にどの群でも有意な差は見られなかった (Figure 2-13(A))。しかし、分化型癌では control と比較して LF×2 群では有意な差が見られ、LF×1 群でも減少傾向が見られた (Figure 2-13(B))。

各群 12 匹中で癌が発生した匹数と、ラット一匹当たりの未分化型癌と分化型癌の発生数は Table2-10 に示した。

Table2-10 Classification by the organization science of Adenocarcinoma

Group	n	undifferentiated carcinoma (embryonal・mucinous・Signet ring cell)		Department type cancer (well differentiated・poorly differentiated)	
		Rat number	Rat/cancer	Rat number	Rat/cancer
control	12	6	0.5±0.52	9	0.75±0.75
LbLF×1	12	4	0.33±0.49	3	0.25±0.45
LbLF×2	12	4	0.33±0.49	2	0.17±0.39

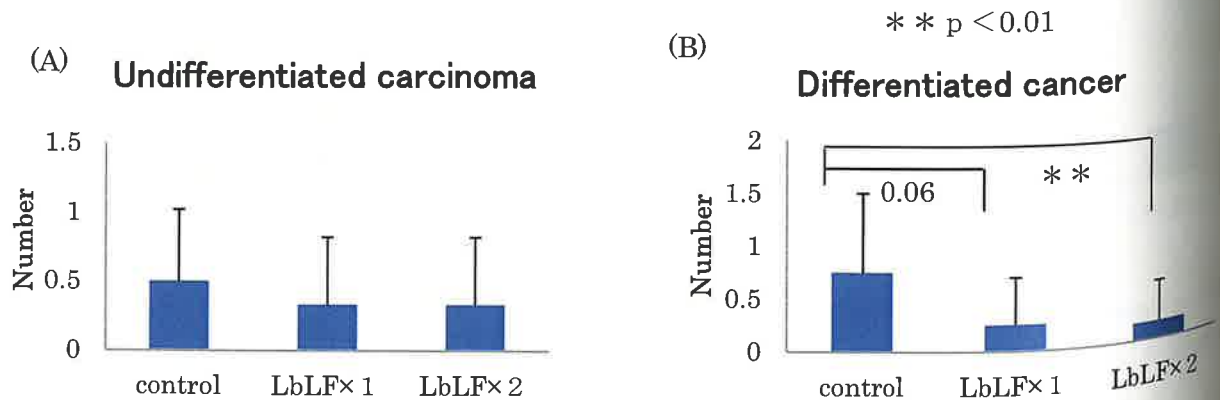


Figure2-13 (A)The number of generation /rat(B)number of generation /rat

第四節 小括

今回の実験では LF による抗腫瘍効果を検討するため、DSS-DMH 処理された動物を用いて検証した。

ACF の数は control に比べ LF 濃度依存的に減少し、肉眼的観察による腫瘍数は control に比べ LbLF×2 で一匹あたりの腫瘍の発生数、腫瘍の大きさが有意に低下した。

組織学的観察において腺腫・腺癌ともに control に比べ LF 濃度依存的に有意に減少した。腺腫は癌化しやすいといわれており、LF によって腺腫の数を減少させた。また、結腸を 3 つの部位、上行部、屈曲部、下行部に分けたが、下行部で最も腺腫が発生した。このことは他の論文でも同じ結果が得られた。下行部でも LF は発生を抑えた。

一匹あたりの腺腫の発生数においてはどの群にも有意差がみられた。

腺腫の異型度別では Mild・Moderate・Severe いずれも control と比較して LbLF×2、LbLF×1 で有意な差がみられ、一匹あたりの腺癌の発生数も control と比べ濃度依存的に減少した。腺癌の分類した未分化型癌と分化型癌で未分化型癌では有意な差はみられなかったが、未分化型癌と比較して悪性度の低い分化型癌では control と LbLF×2 では有意な差がみられた。

これらのことから前癌病変である ACF や、腺腫、未分化型癌と比較して悪性度の低い癌を抑制していることから、LF は比較的癌の初期段階で効果があると考えられる。

第三章 大腸癌細胞株 (RCN-9) を用いた bLF による増殖抑制作用のメカニ ズム検討

第一節 はじめに

厚生労働省から発表されている平成 26 年度の死因順位別死亡数・死亡率(人口 10 万対)において第一位が悪性新生物である。更に、癌の死亡率を部位別で見ると男女ともに大腸癌が急速に増加しており、特に女性は大腸癌が一位となっている。(14)

しかし、大腸癌は早期に発見できれば完治が可能な病気であり、大腸癌を早期発見し、未然に防ぐことが重要だと考えられる。その対策として以前から食物繊維を摂取することや、動物性脂肪を控えることなどが挙げられている。最近ではこれらの食生活による予防に加え、様々な食品や食材を使用した研究が行われており研究が進んでいる。

このように死亡原因の第一位である癌は大きな問題であり、これらを未然に防ぎ健康の維持増進をしていくことが重要だと考えられる。

ラクトフェリン (LF) は 1939 年にデンマークのゼーレンセン博士により、牛乳の中から赤い色をしたタンパク質として発見された。分子内に 2-3 個のシアル酸からなる糖鎖を保有する糖で構造は 700 以上のアミノ酸が結合した一本鎖のポリペプチドで、ほぼ同じ数のアミノ酸からなる C 末端と N 末端はジスフィルド結合で球状に丸くなり、二つの球体が結合したような構造をしている。(15)

その後の研究から、鉄を結合する性質を持っていることが分かり、ラクト(乳)とフェリン(鉄と結合するタンパク質)をつなげて、ラクトフェリンと名前が付けられた。その後、1960 年にヒトとウシの乳より精製され、アミノ酸配列が

決定された。

鉄トランスポートファミリーに属し (16)、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 (17-19)。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ているおり、乳児の健康維持のために必要な成分であると考えられている。(20) このように様々な外分泌液中に含まれている LF は生体内で多彩な機能を発揮していると推定されるが、主な作用として、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る。(21) これらの作用により基づき LF は生体を感染から守るのに重要な役割を果たしていると考えられる。(22)

そのため現在ではこれらの効能を生かし、体脂肪を減少させるサプリメントや、歯周病、高コレステロール血症、関節炎に対するものまで様々な領域で LF は研究されている。

他の成分と大きく異なることは多量摂取しても副作用がないといわれているためでもあり、大腸癌に効果が期待できるものとして高不飽和脂肪酸や、カロチノイド、カテキン、ポリフェノールなどが、癌予防に効果があることが研究によって知られている。しかし、これらは発癌予防有効量を超えると毒性があるということもわかっており、そのため人の臨床実験まで至っていない。また、研究によって LF は発癌予防として、血管新生阻害 アポトーシス誘導 免疫賦活 抗炎症 発癌物質の活性化阻止これらの作用が重なり発癌予防に効果があるといわれておりこれらが発癌に有効であるといわれている。中でもアポトーシスは癌予防、癌の治療にとっても重要な働きを示すといわれている。(23-24) LF の癌抑制効果は *in vitro* で示されており (25)、その役割として Caspase-3 を誘導しアポトーシスを誘導するためだと考えられている。

先行研究の動物実験において LF を投与することにより早期段階からの前癌病変の発生抑制効果が示された。また、腺腫の発生において、LF の長期間摂取による発生抑制効果が示された。腺癌の発生においても、LF 摂取による早期段階からの発生抑制の可能性が示された。

これまでの研究で、bLF の効果については、生体内の Lactoferrin (LF) をノックダウンさせたマウスで研究を行っているものがある。(26) それによると、生体内の LF をノックダウンしたマウスで異型性、腫瘍の数が WT より増加しており、TUNEL でアポトーシスを検討したものでは、WT より低下しており、LF がノックダウンされることでアポトーシスが抑制され、アポトーシスには LF が必要であるということが示された。また、細胞周期の細胞を増殖させる p-AKT が増加した結果が得られた。

LF は大腸癌細胞に対する作用機序についての研究は少なく不明な点が多いため今回は、LF の濃度による違いによる影響・効果を検討するため、濃度を変化させ行った。

そこで LF の詳しいメカニズムを検討するため in Vitro で研究を行った。内容としては、ラット大腸癌細胞株 (RCN-9) の細胞増殖において LF を投与し細胞の増殖数の変化をみる。次に細胞周期に関係する遺伝子 (CyclinD1) の m-RNA の発現量を検討し、さらにウエスタンブロットでタンパク質 (CyclinD1, p-21) の発現を検討した。更にフローサイトメトリーを用いてアポトーシスを検討した。

第二節 材料および方法

第一項 材料

RCN-9 細胞は F344 ラットに DMH で発癌を誘発させた大腸がん細胞株 (JCRB0167) は独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクから購入した。Lactoferrin は Ishikado (27) らの方法により調整されたもの (サンスター、大阪) を使用した。抗体 (CyclinD1、p-21、p-BCL2、t-BCL2、Cleaved Caspase 3、Caspase 3、GAPDH、p-p53、p-53、p-ERK1/2、t-ERK1/2、p-AKT、t-AKT、 β -actin) は Santa Cruz Biotechnology (CA) から購入した。

第二項 bLF の大腸癌細胞増殖抑制の評価

RCN-9 細胞は 3×10^3 cell を 10 cm の dish に播種し、一晚インキュベータ内 (100%湿度、5%に参加炭素、37°C環境) で培養した。培地は RPM I 1640(nacalai tesque)を使用し、培地に 10% (v/v) の非動化牛胎児血清 (FBS:Eqitech-Bio,Inc.) と 100U/ml のペニシリン-ストレプトマイシン (Invitrogen) を添加した。

LF は cell を播種した日と cell を播種して 2 日目と 5 日目に bLF 1mg/ml、bLF 10mg/ml、bLF 100mg/ml になるように添加した。

1 日目、2 日目、4 日目、6 日目に cell を数えた。0.05%トリプシンで細胞を回収し、細胞のカウントは “COULTER” (arufabaio 株式会社 広島) を使用した。

第三項 CyclinD1 の m-RNA 発現の定量

培養液を取り除き氷冷 PBS で洗う。トリゾル試薬 1ml をスクレーパーで

細胞を回収し5分放置した。クロロホルム 0.2ml を入れ攪拌し、3分放置しその後 12000rpm で 20分 4℃で遠心分離させた。上層部だけを取り出しチューブに入れた。イソプロパノールを 1 : 1になるように入れ、攪拌その後放置、さらに 12000rpm で 15分 4℃で遠心分離した。totalRNA 濃度の測定は NANO-DROP 1000 を使用し、totalRNA 1 μ g/ml と RNA-ase FreeWater 10 μ g と混合させ、ReverTra Ace® (東洋紡) キット、5 \times RT Buffer 4 μ l、dNTP Mixture(10mM) 2 μ l、Random Primer 1 μ l、Rever tra Ace1 μ l、rRNase Inhbt 1 μ l を混合させ、BIO RAD に。Go Tag Green12.5 μ l、PrimerF/R 1 μ l、Free Water9.5 μ l、サンプルを 1 μ l、合わせ BIORAD で CyclinD1 (30 サイクル、60℃) GAPDH (32 サイクル、56℃) で PCR し、その後電気泳動し、測定した。

第四項 ウェスタンブロットによるタンパク質の検出

LF が RCN-9 細胞の細胞周期に影響を与えるタンパク質の発現についてウェスタンブロット法を用いて検討した。細胞は PBS で洗浄しスクレーパーで回収した。それに Triton1ml と TPCK, DTT, PIN, Na3VO4, TLCK、PMSF をそれぞれ 1 μ l ずつ合わせたものを 120 μ l 入れ混和させた。その後蛋白質の量を測定し、15 μ g をゲルに入れ電気泳動した。それを PVDF メンブレンに転写させ、ブロッキングにスキムミルクを使用した。その後、抗体を 4℃Cover night で反応させ、二次抗体を 1時間反応させ ECL Western blotting detection system (Amersham biosciences) を用いて検出した。

プライマーは CyclinD1 primer F (cgcaatgacccccgcacgatt) primer R (gcacagaggcaacgaaggt) GAPDH primerF

(GCATCCTGGGCTACACTGAG) primer R
(TCCACCACCCTGTTGCTGTA) を用いた。

第五項 LRP1 受容体を阻害したときの bLF の評価

LF の受容体と考えられている LRP1 をノックダウンすることにより、LF と LRP1 の影響について検討した。

OPTI-MEM (OPTI-MEM[®] I (+)HEPES (+) 2.4g/L Sodium Bicarbonate (+) L-Glutamine life technologies) 250 μ l と、ノックダウンに RNAiMAX5 μ l (Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent life technologies)、si-LRP1 (r Lrp1 CGA GCG ACC UCC UAU CUU UUU AAA GAU AGG AGG UCG CUC GUU Lot No BNC-2-000319 BONAC CORPORATION) を 5 μ l、ノックダウン(-)に OPTI-MEM10 μ l を混和させた。13 分放置後、混合させる。

第六項 統計処理

有意差検定には unpaired two-tailed Student's t-tests を使用した。P 値が 0.05 未満のとき有意差ありと判断した。

第三節 結果

第一項 bLF による大腸癌細胞株の成長抑制効果

まずは bLF の濃度の違いによる細胞の増殖の変化を検討した (Figure 3-1)。RCN-9 細胞は継時的に増殖し、bLF 濃度依存的に抑制した。また、6 日目では control と比較してどの群も有意に抑制した。

細胞の増殖について Flow cytometry において検討した結果である (Figure 3-2)。細胞増殖に関係する G0/G1 期において特に G0 期は細胞の分裂を止め、細胞増殖を抑える効果がある時期である。Control と比べ濃度依存的に増加していることがわかる。LF は DNA の合成を抑えた結果、細胞増殖が抑えられた。

細胞増殖に関わる CyclinD1 について Western blotting で検討した (Figure 3-3)。bLF の濃度依存的に CyclinD1 の発現が抑えられた。

細胞周期に関わり、細胞分裂を抑える働きの p-21 をウエスタンブロットで検討した (Figure 3-4)。これも bLF の濃度依存的に増加した。

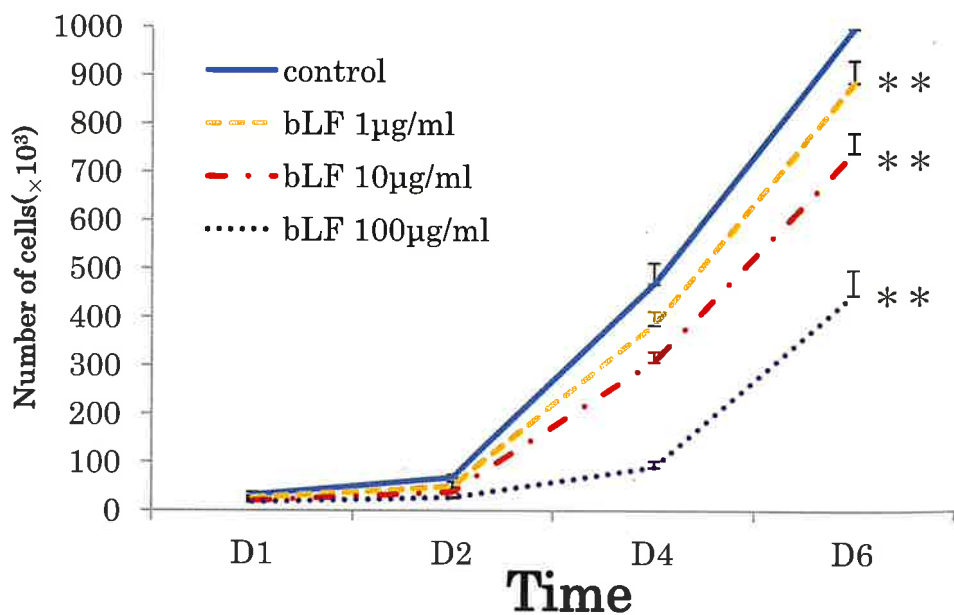


Figure 3-1 As a result of the multiplication experiment using RCN-9 cell.

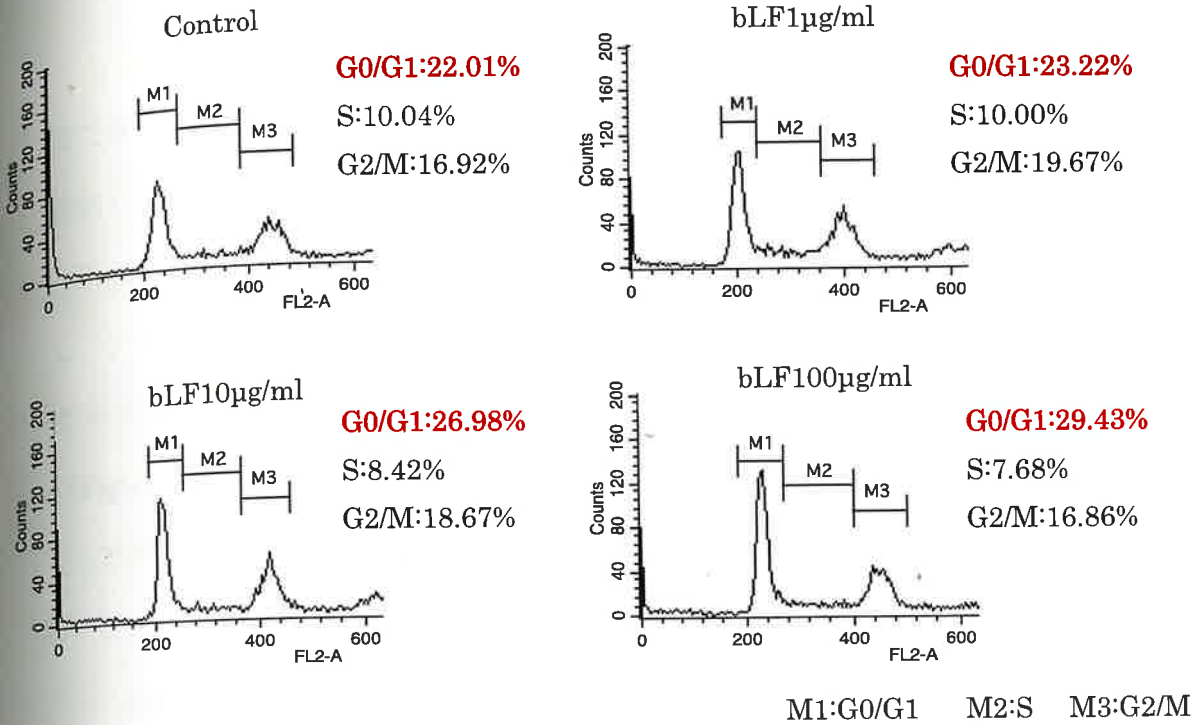


Figure 3-2 The consideration which is cell cycle in flow cytometry

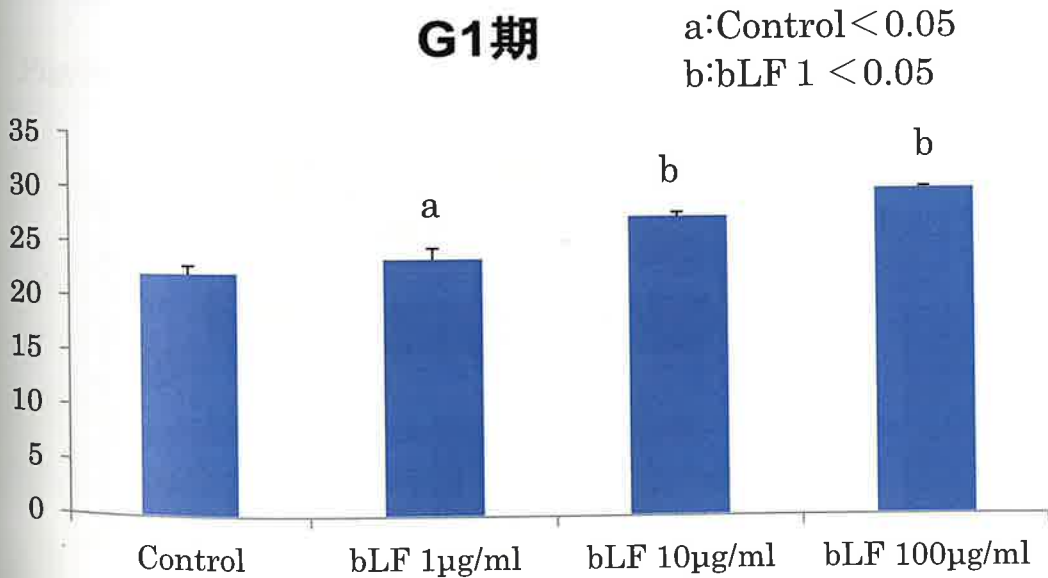


Figure3-3 Consideration of for only G1

(A)

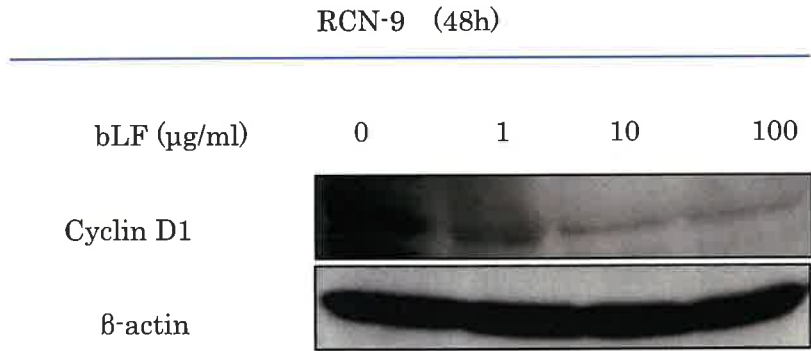


Figure Manifestation of CyclinD1 by RCN-9 cell

(B)

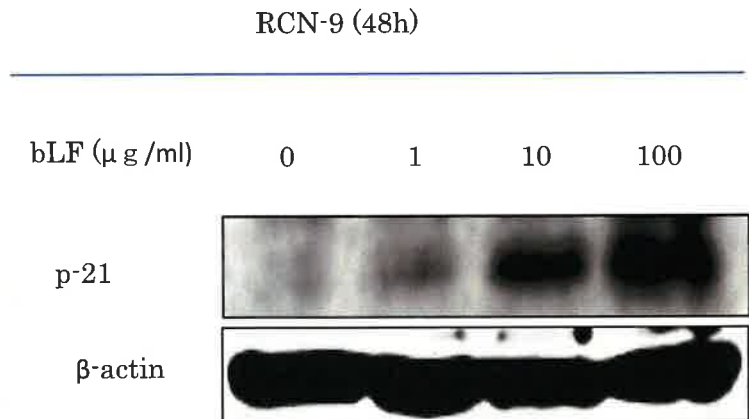


Figure 3-4 (A) Manifestation of CyclinD1 by RCN-9 cell
(B) Manifestation of p-21 by RCN-9 cell

第二項 bLF によるアポトーシス誘導についての検討

細胞の増殖に関わる、細胞周期においてフローサイトメトリーで検討した結果

(Figure 3-5)、bLF の濃度が高くなるにつれアポトーシスの割合が有意に増加

し、アポトーシスが誘導されていることが分かる。

ウェスタンブロット法でアポトーシスに関与する経路について検討した

(Figure 3-6)。細胞を増殖させる因子の p-BCL2 は bLF の濃度依存的に減少

し、アポトーシスを誘導させる caspase-3 は濃度依存的に増加した。(Figure 3-7)

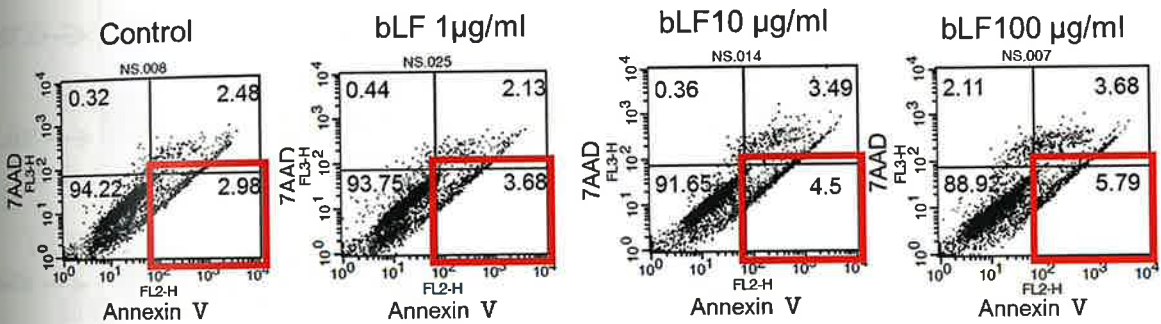
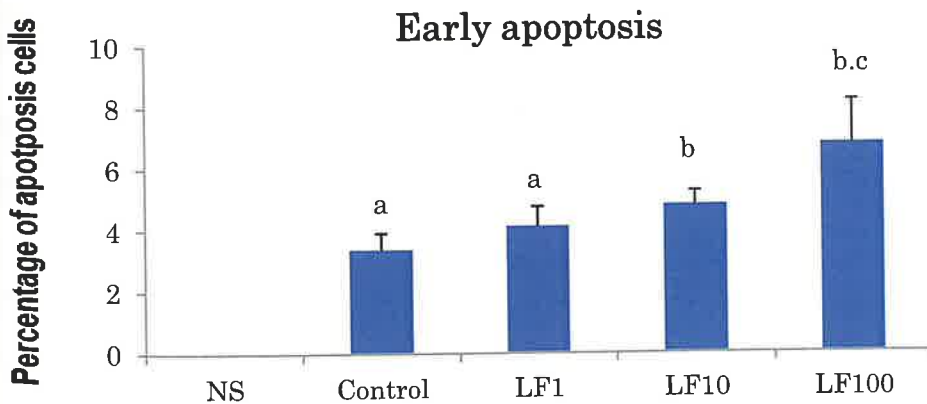


Figure 3-5 Lead of cell cycle by flow cytometry



a: NS < 0.01 b: NS < 0.05 c: Control < 0.01

Figure 3-6 Manifestation of Early apoptosis by flow cytometry

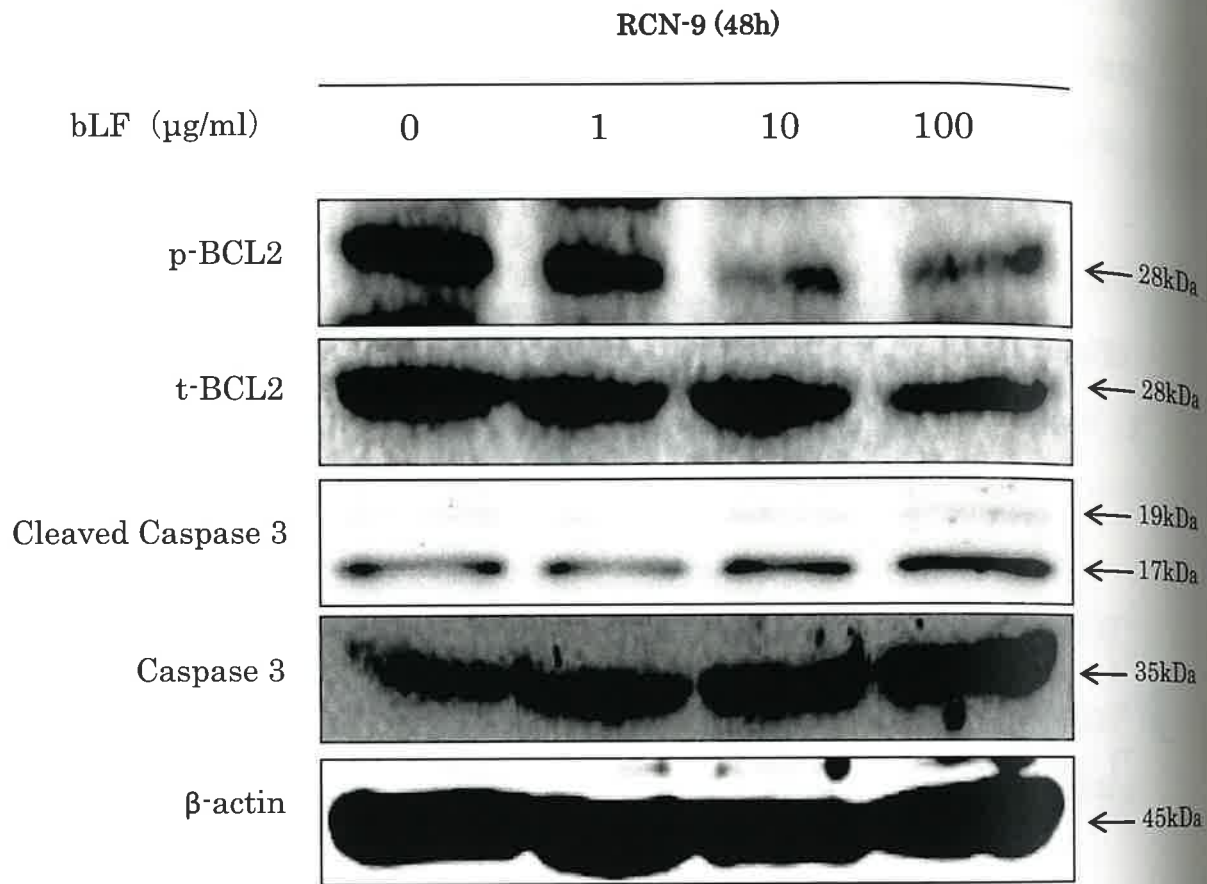


Figure 3-7 Manifestation of an apoptosis lead factor by RCN9 cell

第三項 LRP1により取り込まれた大腸癌細胞株のbLF効果

まずは、LRP1が阻害されているか、確認の実験を行い、確実にLRP1は阻害された。(Figure 3-8)

続いて、LRP1を阻害したsi-LRP1において細胞増殖の検討を行った。阻害していないときの(Figure 3-9)と同様に継時的に細胞は増殖した。6日目ではcontrolと比較してLbLF100 μ g/mlで有意に減少した。LRP1を阻害したsi-LRP1とそれにLFを添加したものがControlよりも抑制され、LbLF100 μ g/mlよりも増殖していることからLRP1はLFの受容体として関与していることを示している。

細胞周期に関係するCyclinD1の遺伝子発現量を検討した。LRP1が阻害されることにより、controlと比較して少し低下する。しかし、最も減少するのはbLF100 μ g/mlのときである。

同様にCyclinD1をウエスタンブロット法でタンパク質の発現を検討した。(Figure 3-10) LRP1をノックダウンすることにより、CyclinD1の発現はbLF0 μ g/mlと比較して抑制されているが、si-LRP1(-)bLF100 μ g/mlを与えた群で最も発現は抑制された。

Caspase3も同様にLRP1が阻害されることによりcontrolと比較して増加する。(Figure 3-11)最も増加したのはbLF100 μ g/mlである。

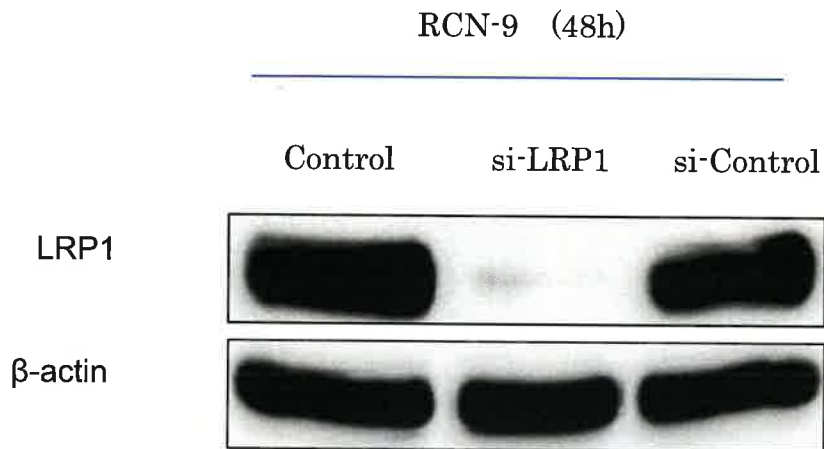


Figure 3-8 Manifestation of LRP1 by RCN9 cell

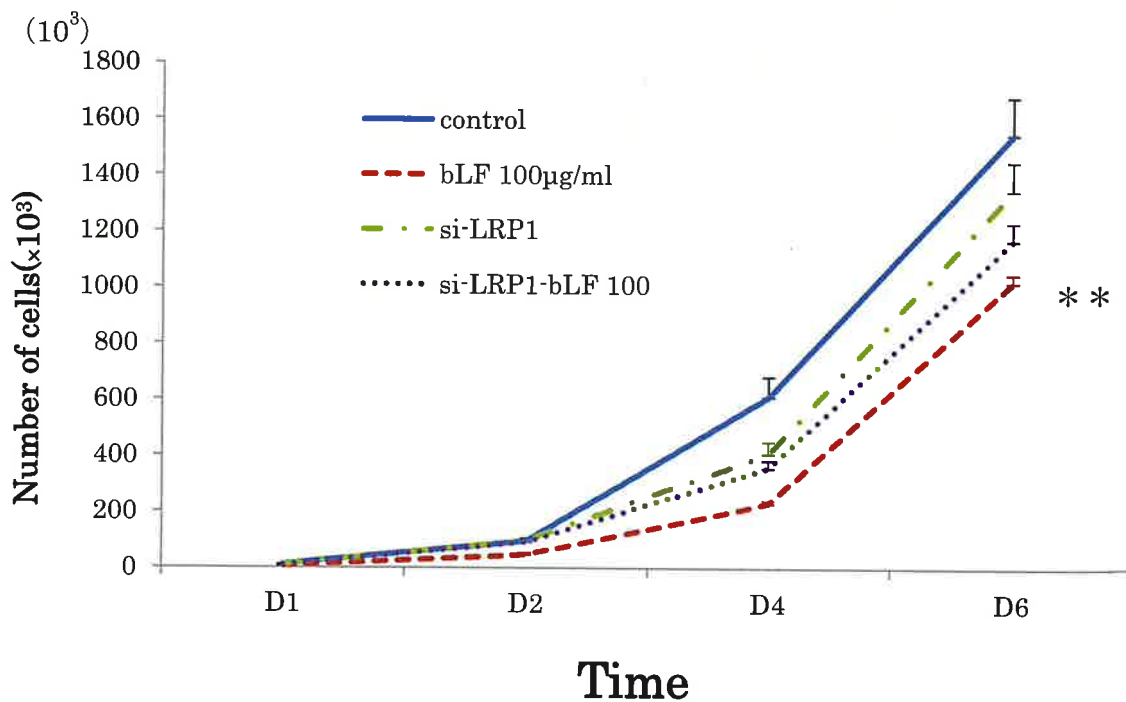


Figure 3-9 As a result of the multiplication experiment of CyclinD1.

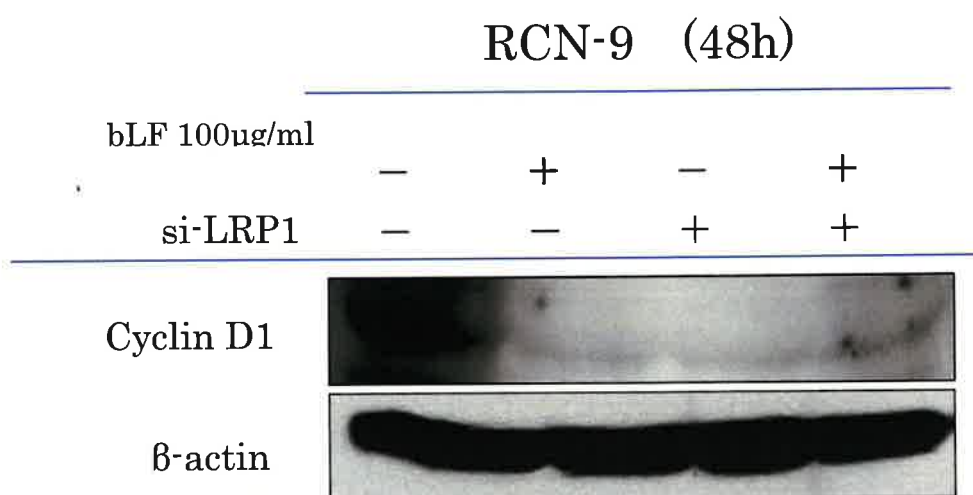


Figure 3-10 Manifestation of CyclinD1 using siLRP1 by RCN9 cell

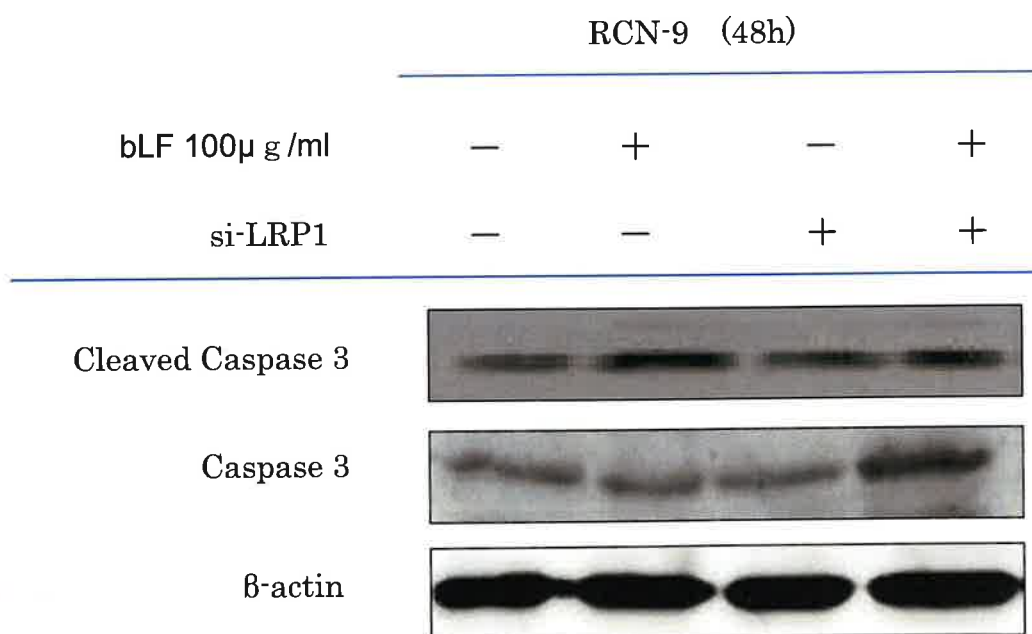


Figure 3-11 Manifestation of Caspase3 using siLRP1 by RCN9 cell

第四項 bLF が細胞周期を抑制し、LRP1 から p53 を経由するアポトーシスの検討

p53 は様々ながん抑制効果に関係しており、細胞周期では G1 期で周期を停止させ、アポトーシスを誘導に関与している。そのため、p53 の発現について検討した。

LF の濃度依存的に p53 は増加している。(Figure 3-12)

LRP1 を阻害したものでの検討を行った。(Figure 3-13) si-LRP1、(LRP1 を阻害すること) により LF が取り込まれず、p53 が誘導されず、bLF 100 μ g/ml と比べ si-LRP1 のもの 2 つとも抑制されていることがわかる。

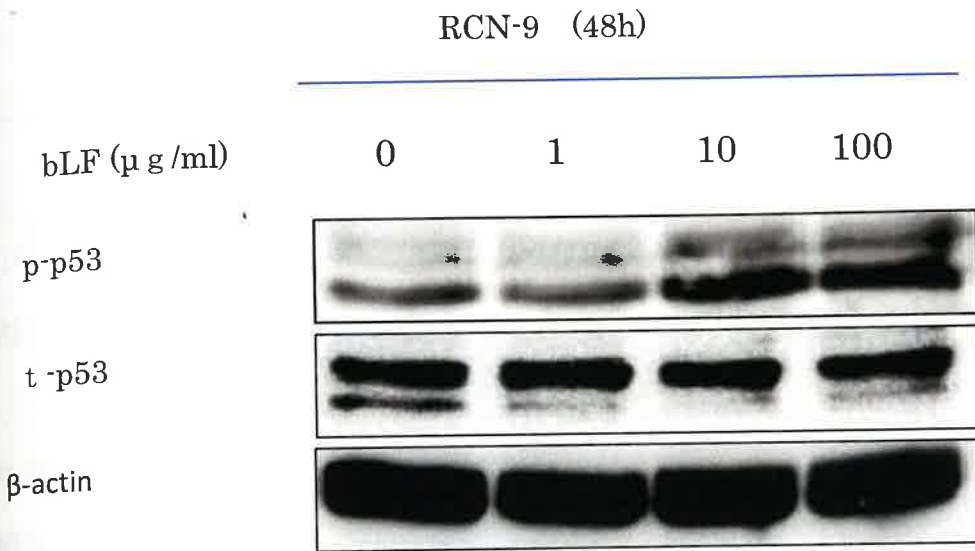


Figure 3-12 Manifestation of p-p53 using RCN9 cell

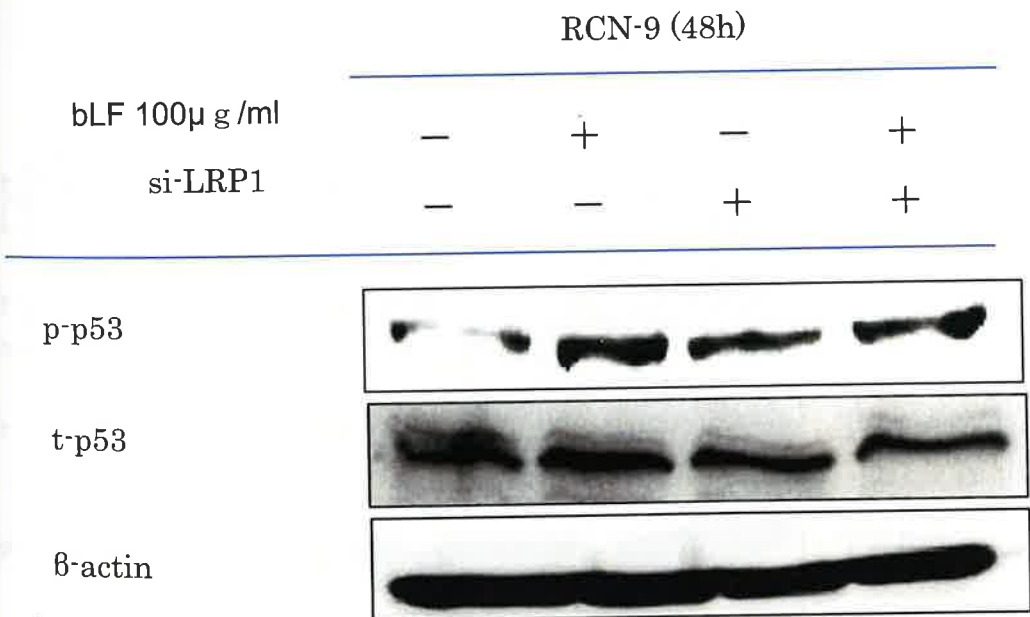


Figure 3-13 Manifestation of p-p53 using si-LRP1

第五項 AKT と ERK を経由する bLF の抑制効果

bLF の濃度依存的に検討した結果、細胞を増殖させる p-ERK、アポトーシスを阻害させる p-AKT を抑制していることが分かった。(Figure 3-14)

si-LRP1 でも同様に p-ERK、p-AKT について検討した。こちらも LRP1 を阻害し、LbLF 100 μ g/ml 添加したものは p-ERK、p-AKT が抑制された。(Figure 3-15)

これらのことをまとめると (Figure 3-16)、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 の発現が上昇する。それによって BCL2 が低下し、その下流であり、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る。

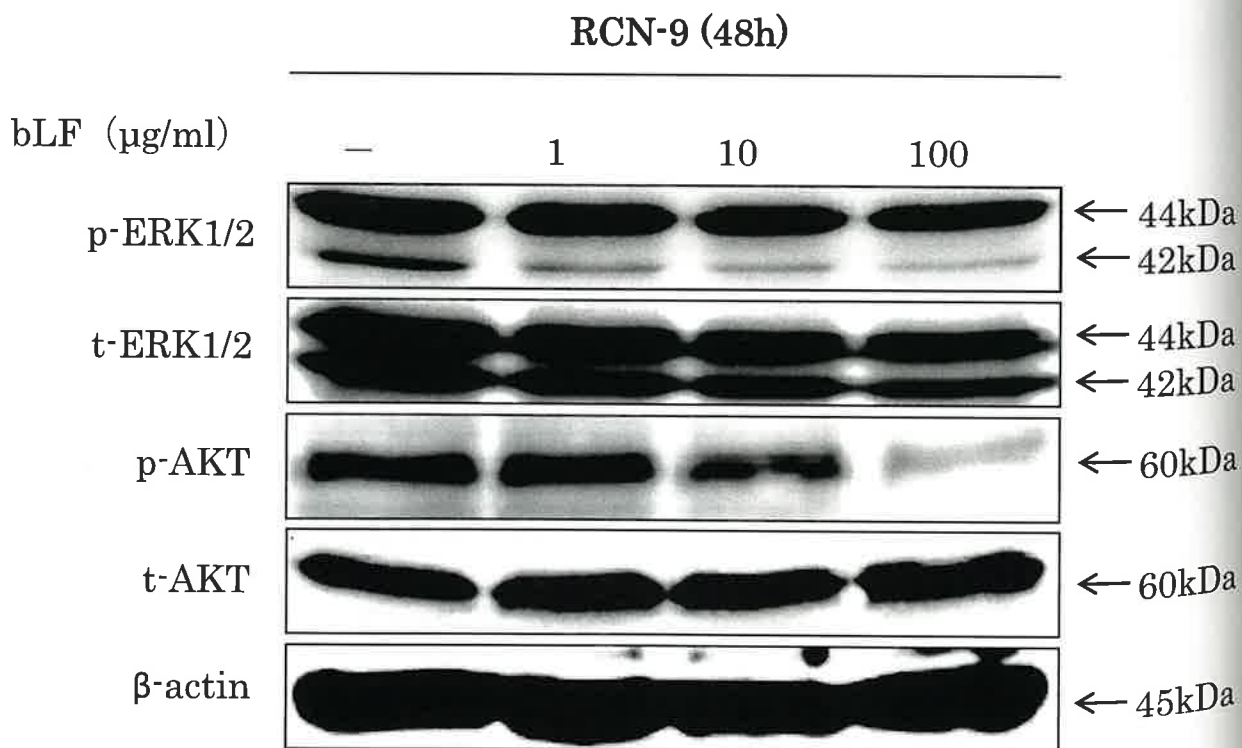


Figure 3-14 Consideration in AKT and a ERK course using RCN9 cell

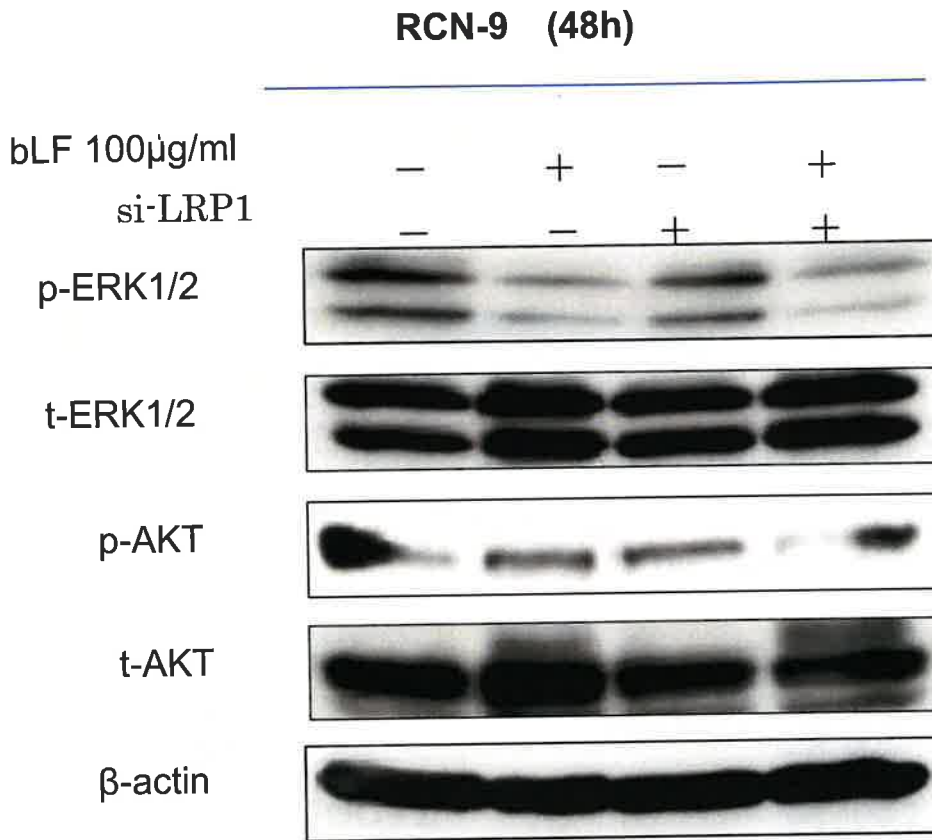


Figure 3-15 Consideration in AKT using si-LRP1 and a ERK course

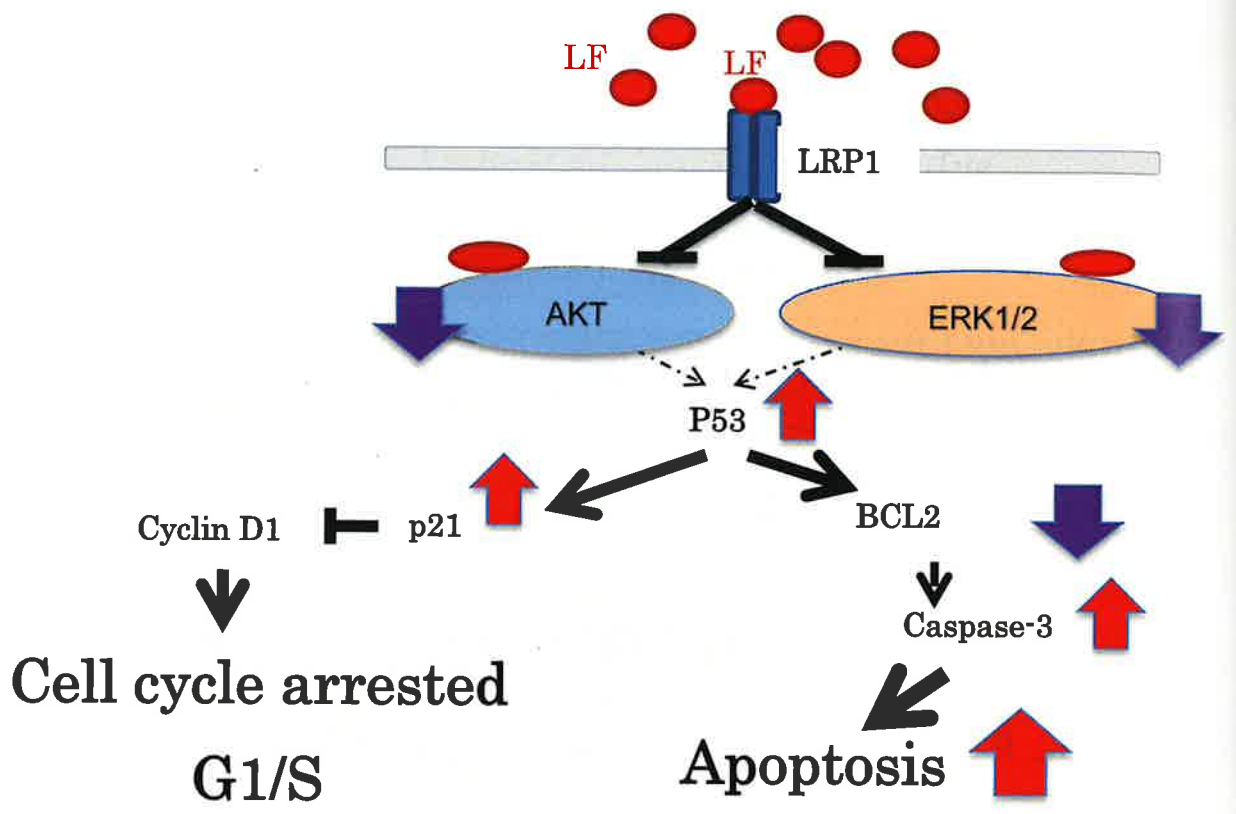


Figure 3-16 The mechanism to which LF leads apoptosis

第四節 小括

本章では、bLF が大腸癌細胞株に与える細胞増殖、細胞周期の影響とアポトーシスを誘導するそのメカニズムについて検討した。

bLF を大腸癌細胞株 RCN-9 細胞に添加し、6 日間培養した結果、bLF 投与による癌細胞の増殖変化は bLF の濃度依存的に有意に抑制され、濃度が高くなるにつれ bLF が癌細胞を抑制するという効果は十分に示唆された。

増殖に関わる細胞周期を検討したが、G0/G1 期では bLF の濃度が高くなるにつれ増加した。その結果細胞の分裂を止め、細胞増殖を抑える効果があった。

細胞増殖に関わる CyclinD1 の発現も bLF 濃度依存的に抑制された。また、p21 も濃度依存的に増加し、細胞増殖を抑制する効果が得られた。

アポトーシスについてはフローサイトメトリー (PI) で検討し、アポトーシスの割合が増加し、ウェスタンブロットではアポトーシスを抑制傾向の遺伝子は発現が抑制され、アポトーシスを誘導する遺伝子は発現が促進された。

bLF 受容体 LRP1 と bLF の効果について細胞増殖の結果から、bLF の受容体の一つが LRP1 であると示唆された。

bLF は p53 を誘導し、アポトーシスを引き起こした。p-p53 は bLF の濃度依存的に発現が認められた。LRP1 をノックダウンした実験においても LRP1 との関係も示唆され、si-LRP1 では LRP1 をノックダウンして bLF を添加していないものに比べ発現が認められたが、LRP1 をノックアウトせず bLF 100 μ g/ml 添加したものが最も発現が認められた。このことは bLF の受容体である LRP1 をノックダウンすることで多少の p-53 発現は認められる。しかし、それらより

も LRP1 をノックダウンせず bLF 100 μ g/ml 投与したもので最も発現が認められた。

AKT と ERK を経由した bLF の抑制効果については p-ERK、p-AKT の発現が抑制されたことにより効果は示された。また、si-LRP1 での実験においても LRP1 で取り込まれ、p-ERK、p-AKT が抑制された。とくに p-ERK が抑制された結果は他の論文でも示されている。(28)

このことから、bLF は LRP1 で取り込まれ p-ERK、p-AKT を抑制しアポトーシスを誘導することが示唆された。

今回の実験から、bLF は大腸癌細胞株において細胞増殖を抑制、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 は大腸癌細胞株抑制に効果があると考えられる。

今回の結果から、bLF が受容体 LRP1 で取り込まれ、AKT、ERK を抑制しながら p53 を発現させ BCL2 の抑制の後 Caspase3 を促進させアポトーシスを誘導させることは示唆されたが、それ以外の詳しいメカニズムは明らかとなっていない。また、bLF には免疫機能や酸化防止として癌に効果があるとされており(29-31)、NK 細胞などにも関与しており、これらを増加させるという論文もある。(32)

本研究ではこれから大腸癌は男女ともに更に増加すると考えられる。そのため、癌を予防・早期発見することも重要であり、更に癌を治療していく方法も必要である。

本研究では、大腸癌細胞株を用いて bLF の効果と作用機序を明らかにした。

本研究の結果は大腸癌による予防や、癌に対する効果を示したものであるため、
これからの大腸癌に対しての効果が期待できる。

第四章 総括

癌や腫瘍を予防、もしくは進行させないためには細胞の増殖抑制や、アポトーシスが有効であると考えられる。

今回の実験から、bLFは大腸癌細胞株において細胞増殖を抑制、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は大腸癌細胞株抑制に効果があると考えられる。

今回の結果から、bLFが受容体LRP1で取り込まれ、AKT、ERKを抑制しながらp53を発現させBCL2の抑制の後Caspase3を促進させアポトーシスを誘導させることは示唆されたが、それ以外の詳しいメカニズムは明らかとなっていない。また、bLFには免疫機能や酸化防止として癌に効果があるとされており(29-31)、NK細胞などにも関与しており、これらを増加させるという論文もある。(32)

これから大腸癌は男女ともに更に増加すると考えられる。そのため、癌を予防・早期発見することも重要であり、更に癌を治療していく方法も必要である。

本研究では、大腸癌細胞株を用いてbLFの効果と作用機序を明らかにした。本研究の結果は大腸癌による予防や、癌に対する効果を示したものであるため、これからの大腸癌に対しての効果が期待できる。

潰瘍性大腸炎はLFは抗炎症、抗菌、抗腫瘍、免疫調節、アポトーシス誘導などがあり、抗腫瘍効果や、アポトーシス誘導の効果があるが、どのような経路で作用するか、詳しいことは明らかになっていない点も多い。そこで、本研究ではbLFの潰瘍性大腸癌関連大腸癌抑制効果・作用について明らかにすることを目的とした。

動物実験において、腫瘍の大きさ、異型度の違い、分化度の違いを検討し、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、その結果腺腫、

腺癌の発育を抑制した。

動物実験で得られた結果を詳しく検討細胞を用いた実験では細胞周期の細胞増殖抑制や、p 53、Cleave caspase3 によるアポトーシス誘導によって癌が抑制された。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。

bLF の抗腫瘍効果とメカニズムについての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。

- 1) 厚生労働省 人口動態統計
- 2) 岡安勲 慢性炎症から発癌へ 神奈川医学会雑誌 第39巻 第2号 (平成24年7月)
- 3) Zisman TL, Rubin DT: Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14:2662-2669:2008
- 4) Morson BC : Cancer in ulcerative colitis. *Gut* 7 :425-426, 1966
- 5) Dobbins WO, et al : Early detection and prevention of carcinoma of the colon in patients with ulcerative colitis. *Cancer* 40:2542-2548, 1977
- 6) Riddel RH : Dysplasia in Inflammatory Bowel Disease, Pathology of the Colon, Small intestine, and Anus : 77-107, 1983, New York
- 7) 多機能タンパク —ラクトフェリン— 中島啓介 九州歯会誌 62 (6) : 253~256, 2009
- 8) Identification of Unprecedented Anticancer Properties of High Molecular Weight Biomacromolecular Complex Containing Bovine Lactoferrin (HMW-bLf)
- 9) Ishikado , Imanaka H, Takeuchi T, Harada E, Makino T Liposomalization of lactoferrin enhanced it's anti-inflammatory effects via oral administration. *Biol. Pharm. Bull.* 28(9)1717-1721(2005)
- 10) ラットの結腸間移植回腸における DMH 発がん 日消外会誌 18 (8) : 1875 ~1879, 1985年 安富正幸
- 11) Inhibition of 1, 2-dimethylhydrazine-induced mucin-depleted foci and O⁶-methylguanine DNA adducts in the rat colorectum by boiled garlic powder. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010;11(5):1301-4. Chihara T1, Shimpo

- K, Kaneko T, Beppu H, Mizutani K, Higashiguchi T, Sonoda S.
- 12) Morphological and Molecular Alterations in 1,2 Dimethylhydrazine and Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rats Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2011,
 - 13) 大腸癌取扱い規約 第8版 大腸癌研究会/編 金原出版株式会社 2013年
 - 14) 厚生労働省：人口動態統計
 - 15) 多機能タンパク —ラクトフェリン— 中島啓介 九州歯会誌 62 (6) : 253~256, 2009
 - 16) Jessica A Gibbons, Jagat R Kanwar, Rupinder K Kanwar: Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer: BMC Cancer, 15 2015
 - 17) Effect of lactoferrin protein on red blood cells and macrophages: mechanism of parasite-host interaction
 - 18) Identification of Unprecedented Anticancer Properties of High Molecular Weight Biomacromolecular Complex Containing Bovine Lactoferrin (HMW-bLf)
 - 19) Baker EN, Baker HM. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. Cell Mol Life Sci. 2005;62:2531-9.
 - 20) ラクトフェリン学会
 - 21) 難病情報センター Japan Intractable Disease Information Center
 - 22) 多機能タンパク質ラクトフェリンの抗真菌作用と医療への応用 山口英世 化学と生物 Vol. 38NO. 9, 2000
 - 23) Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin

- expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer.
- 24) Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer.
- 25) Identification of Unprecedented Anticancer Properties of High Molecular Weight Biomacromolecular Complex Containing Bovine Lactoferrin (HMW-bLf)
- 26) Ye Q, Zheng Y, Fan S, Qin Z, Li N, et al. : Lactoferrin Deficiency Promotes Colitis-Associated PLoS ONE (2014) Lactoferrin Deficiency Promotes Colitis-Associated Colorectal Dysplasia in Mice
- 27) Human trial of liposomal lactoferrin supplementation for periodontal disease.
- 28) Mantuano E1, Lam MS, Gonias SL. LRP1 Assembles Unique Co-receptor Systems to Initiate Cell Signaling in Response to Tissue-type Plasminogen Activator and Myelin-associated Glycoprotein* J Biol Chem 2013 Nov 22; 288
- 29) Gupta I, Sehgal R, Kanwar RK, Sehgal A, Kanwar JR. Recent advances of metal binding protein lactoferrin as an antimicrobial agent. Curr. Bioactive Comp. 5(3), 226-233 (2009).
- 30) Burrow H, Kanwar RK, Kanwar JR. Antioxidant enzyme activities of iron-saturated bovine lactoferrin (Fe-bLf) in human gut epithelial cells under oxidative stress. Med. Chem. 7(3), 224-230 (2011).
- 31) Burrow H, Kanwar RK, Mahidhara G, Kanwar JR. Effect of selenium-saturated bovine lactoferrin (Se-bLF) on antioxidant enzyme activities in human gut epithelial cells under oxidative stress.

Anticancer Agents Med. Chem. 11(8), 762-771 (2011).

- 32) Masaaki Iigo, David B. Alexander, Jiegou Xu, Mitsuru Futakuchi, Masumi Suzui, Takahiro Koza, Takayuki Akasu, Daizo Saito, Tadao Kakizoe, Koji Yamauchi, Fumiaki Abe, Mitsunori Takase, Kazunori Sekine, and Hiroyuki Tsuda :Inhibition of intestinal polyp growth by oral ingestion of bovine lactoferrin and immune cells in the large intestine: Biometals. 2014; 27(5): 1017-1029

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました県立広島大学人間文化学部健康科学科 嶋本 文雄 教授 県立広島大学生命環境学部生命科学科の 達家 雅明 教授に深甚なる謝意を表します。

また、折に触れて数々のご指導とご助言を頂戴しました、県立広島大学生命環境学部生命科学科 小西博昭教授、県立広島大学経営情報学部経営情報学科 肖業貴教授に感謝申し上げます。

本研究を進めるに動物実験をサポートしていただいた 斉公営、久保まい、松岡良子、古本梨沙の諸氏に感謝いたします。そして、標本作製にご協力いただきました土谷総合病院病理検査室 森脇奈美氏並びに同病理検査室の皆様にご感謝いたします。

本研究を行うにあたりご指導、ご助言をいただいた大学院医歯薬学総合研究科 大学院医歯薬学総合研究科 高田隆教授 宮内睦美 助教授 の皆様に深謝いたします。