

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	Maryami Yuliana Kosim
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 p53 status modifies cytotoxic activity of lactoferrin under hypoxic conditions (p53 は低酸素環境下でのラクトフェリン細胞傷害活性を修飾する)			
論文審査担当者			
主 査	教授	浅野 知一郎	印
審査委員	教授	武島 幸男	
審査委員	准教授	齋藤 敦	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【背景】</p> <p>ラクトフェリン (LF) は、80kD の鉄結合性糖タンパク質で、抗菌作用、抗炎症作用、免疫調節作用、抗がん作用など幅広い生物学的作用を有するトランスフェリンファミリーの一種である。LF は、涙、汗、牛乳など腺から分泌される様々な液体に含まれており、一般に無毒とされている。現在、ウシラクトフェリン (bLF) は栄養剤として認可されている。また、ラットの大腸、食道、肺、膀胱の発がんに対して抑制的に作用することが報告されており、治療薬としての可能性も示唆されている。しかしながら、LF の抗がん活性の分子機構は十分に解明されていない。一方、低酸素環境は、がんの浸潤能や転移能などの悪性形質や治療抵抗性獲得などに関連することがよく知られている。低酸素誘導性因子 (HIF-1α および HIF-2α) は、様々な低酸素応答性を担う遺伝子群の発現制御を行う重要な転写因子である。また、低酸素微小環境は細胞にストレスを誘発し、がん抑制因子である p53 を活性化し、ゲノムの安定性維持、細胞周期の制御、アポトーシスやフェロトーシスなどの細胞死シグナルを制御しています。フェロトーシスは、細胞内環境の酸化的変化により誘導される最近報告された細胞死の様式であり、鉄キレート剤や抗酸化剤により阻害される。LF は、天然の鉄キレート剤であるため、特にがん細胞においてフェロトーシスを修飾することが予想されている。</p> <p>本研究では、低酸素環境下における LF の細胞障害活性の有無、その分子機構を解明することを目的とし、以下の検討を行なった。</p>			
<p>【結果と考察】</p> <p>MTT 実験の結果、LF の多様な細胞増殖抑制活性が幅広い細胞に認められた。LF は正常線維芽細胞 (TIG-3, KD) , 口腔扁平上皮がん (HSC2) , 肝がん (HepG2) の細胞増殖を阻害した一方、乳がん (MCF-7) および子宮頸がん (HeLa) の感受性は明らかに低かった。すなわち、女性特有臓器に由来する細胞には、LF の細胞毒性に抵抗する特殊な機構が存在している可能性が考えられた。興味深いことに、LF は低酸素環境下で KD と HSC2 に相反する影響を与えたので、その分子機構を明らかにするために、これら 2 つの細胞の特性を比較した。まず、HIF-1α および-2α に対する LF の効果をウエスタンブロッティングにて比較した。低酸素環境下で安定化した HIF-1α および-2α は LF 処理により KD 細胞では顕著に増加したが、HSC2 のそれは減少した。一方、定量的 RT-PCR にて測定した</p>			

HIF 標的遺伝子発現変動は、LF 感受性との明らかな関連性は認められなかった。次に、間葉系組織由来 KD と上皮系組織由来 HSC2 の組織学的な差異について検討したところ、LF は HSC2 の E-cadherin と N-cadherin を減少させ、KD の vimentin を増加させた。すなわち、LF により KD では間葉系表現型が増強されるが、HSC2 では組織学的特徴が失われる可能性が示された。最後に、正常細胞である KD とがん細胞である HSC2 のよく知られた違いである、がん抑制因子 p53 について検討した。p53 タンパクは KD では検出され、さらに LF により増加したが、HSC2 では検出されなかった。アポトーシスや細胞周期に関連する p53 標的遺伝子発現を観察したが、LF 感受性との関連性を示す明らかな変化は認められなかった。次に、変異型 p53 発現プラスミドを安定遺伝子導入した HepG2 (MT5) とコントロールプラスミドを導入した HepG2 (C4) を比較した。MT5 は C4 よりも明らかに LF に対して感受性が高いことが示されたが、p53 標的遺伝子発現には、LF 感受性との関連性を示す明らかな変化は認められなかった。そこで、新たな細胞様式であるフェロトーシスに着目した。フェロトーシス誘導物質である Erastin は、C4 と MT5 の両細胞の増殖を阻害したが、MT5 は Erastin に対して有意に抵抗性であり、さらに、フェロトーシス阻害剤である UAMC-3203 は、特に低酸素環境下で両細胞の Erastin に対する感受性を劇的に低下させた。遺伝子発現解析から、フェロトーシスを抑制する *SLC7A11* が低酸素環境下 C4 にて減少し、低酸素環境下 MT5 では LF にてフェロトーシスを促進する *ACSL4* が増加した。

【結論】

低酸素環境下、HIF や p53 は、さまざまな遺伝子発現制御を介して細胞機能を制御しているが、LF により野生型 p53 を持つ細胞では生存シグナルを、変異型 p53 を持つ細胞では細胞死、特にフェロトーシスを促進する可能性が示された。本研究は、LF の臨床応用に向けた新たな知見の蓄積に貢献した。

よって審査委員会委員全員は、本論文が Maryami Yuliana Kosim に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。