

学位論文（要約）

Ferrichrome identified from *Lactobacillus casei* ATCC334 induces apoptosis  
through its iron binding site in gastric cancer cells

（胃癌細胞において、*Lactobacillus casei* 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）

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

井尻 学見

（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）

## 研究目的

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。

我々の研究室では、プロバイオティクス的一种である *Lactobacillus casei* ATCC334 (*L. casei*) 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。

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。

## 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<sub>510nm</sub> 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<sub>570nm</sub> を測定した。

### 4. Xenograft モデル

ヌードマウス (BALB/c<sup>nu/nu</sup>) 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 $\mu$ 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  $\text{FeCl}_3$  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。プロテインデータバンクに登録された 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、ボンフェローニー補正で  $p < 0.0083$  または  $0.017$  を統計学的に有意な差と判断した。

## 結果

### 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 $\mu$ g/mLの低用量から、MKN-74、NUGCでは100 $\mu$ 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有意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。

## 考察

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

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.