

白血病細胞アポトーシス誘導新規牛乳ラクトフェリン分解産物の同定とその生理機能解明

岐阜大学医学部生化学教室 講師 坂野喜子

(要旨)

牛乳は健康食品として古くより知られており、幼児期の成長にとって必要な骨形成に重要な成分を含むことが知られている。また、栄養食品としてばかりではなく、主蛋白質ラクトフェリンや乳清蛋白などの胃や膵臓中の蛋白分解酵素による分解産物などに有効な多くの生理活性物質を含み、細菌感染防止、免疫賦活、細胞増殖に有効であることが明らかにされている。我々は牛乳蛋白質のプロテアーゼによる分解産物中に骨髓性巨核芽球性白血病細胞Meg-O1の強力なアポトーシス誘導作用を示す物質が存在するのを見出した。この物質を同定したところ、ラクトフェリンのペプシン分解産物であることが明らかになった。ラクトフェリンは、乳中に特に多く含まれているが、好中球の二次顆粒にも含まれることが知られている。また、涙液、鼻汁、唾液、尿、精液、羊水中にも見いだされ、鉄吸収調節作用、抗菌作用、免疫賦活作用、細胞増殖・分化調節作用などの生理機能が知られているが、その作用機構については十分解析されていない。最近、ラクトフェリンのペプシン分解産物ラクトフェリンBが白血病細胞HL60のアポトーシスを誘導することが報告された。我々は、ラクトフェリン分解物中に白血病細胞のアポトーシスを誘導する多種類のペプチドが存在するのを見出した。今回は、ラクトフェリン分解物中のラクトフェリン以外の新規物質を単離精製し、Meg-O1や骨芽様細胞MC3T3-E1に対する増殖、分化への影響とその作用メカニズムについて、細胞内情報伝達系を中心に検討した。また、ラクトフェリン分解産物が固形ガン、特に口腔扁平上皮ガン、および骨肉腫由来の培養細胞（SAS、HSC-4：ヒト舌扁平上皮癌、UMR-106：ラット骨肉腫）に対するアポトーシス誘導の分子生物学的機構を明らかにし、牛乳由来ペプチドのガン細胞増殖抑制機構を検討した。

(方法)

ラクトフェリンのペプシン加水分解物中のアポトーシス誘導因子の精製と同定：

精製牛乳ラクトフェリン（和光社）5g/100mlを蒸留水に溶解し、1N HClでpH3に調整後、ペプシン150mgを添加して37℃で4時間インキュベーションした。反応後80℃で15分間加熱処理を行い、1N NaOHで中和し、10,000rpmで1時間遠心して上清画分を得た。得られた上清画分をセントリコン3000の膜を用いて濃縮し、セファデックスG-50によるカラムクロマトグラフィーを行い、低分子量ペプチドを分画した。各画分のMeg-O1に対するアポトーシス誘導能の判定は、細胞外への遊離乳酸脱水素酵素（LDH）の活性を測定することにより行った。誘導活性を示す2つのペプチド画分（LF1、LF2）

を分離し、濃縮したペプチド画分を実験に使用した。

ヒト骨髄性巨核芽球性白血病細胞Meg-O1に対するラクトフェリン加水分解物の作用：

Meg-O1は武田製薬細胞工学研究所より購入した。細胞は20%FBSを含むDMEMで培養し、 5×10^5 個/mlを5%FBSを含むDMEMに移し、ラクトフェリン分解産物を添加して、アポトーシス誘導を観察する。アポトーシスの変化は、核を特異的に染色するヘキスト33258を用いて細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

ラクトフェリン分解産物 (LF1、LF2) を各種濃度で作用し、各種情報伝達変換酵素 (ホスホリパーゼC、D (PLC、PLD)、MAPキナーゼファミリー (MAPK、p38MAPK、JUNK)、プロテインキナーゼC (PKC)、チロシンキナーゼの変化をmRNAレベルおよび蛋白質レベルで調べた。

各種細胞に対するラクトフェリン加水分解物の影響：

マウス骨芽様細胞MC3T3-E1 (1×10^5) を α -MEM/10%FBS培養液中100mmディッシュで2日間培養後、FBSフリーの α -MEM培地に変換して24時間培養した。FBSフリー培地にラクトフェリン分解産物 (1~10mg/ml) を添加し、72時間培養した。経時的に形態の変化およびシグナル伝達系酵素活性の変化を調べた。

固形腫瘍細胞 (ヒト口腔由来扁平上皮ガン細胞、SAS、HSC-4) はHSRRBより、また、ラット骨肉腫細胞 (UMR-106-01) はATCCより入手した。HSC-4およびUMR-106-01は10%FBSを含むMEM培地で、SAS細胞はF-12/DMEM培地で2~3日培養後、0.3%BSAの無血清培地で24時間培養後、ラクトフェリン分解物で処理した。

ウエスタンブロッティングによる酵素蛋白質量の変化：

各種細胞をラクトフェリン分解産物で処理し、無処理細胞とともに可溶性緩衝液 (トリス緩衝液、pH7.4、1%トリトンX-100、1%SDS、1%コール酸、 $20 \mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、1mM PMSF) に懸濁し、超音波で細胞を破壊する。蛋白質の一定量 (50-100 μg) をSDSサンプル緩衝液で処理した後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ない蛋白質を分離した。分離した蛋白質はPVDF膜に転移後、各種抗体と反応させた後、アルカリホスファターゼ結合の抗ウサギ二次抗体と反応させECL検出試薬を用いてX-線フィルム上に感光させた。

蛋白質の定量はBio-Rad試薬を用いて、Bradfordの方法に従って行った。

ホスホリパーゼC、D (PLC、PLD) 活性測定：

PLCの活性測定は細胞を [^3H] イノシトールで24時間標識し、ラクトフェリン分解産物で処理した後、産生する [^3H] イノシトールリン酸の放射活性を測定した。また、PLD活性測定は、 [^3H] パルミチン酸で12時間細胞を標識し、0.3%ブタノール存在下でラクトフェリン分解産物で処理した後、

産生される [³H] ホスファチジルブタノールPButの放射活性を測定した。

培養腫瘍細胞への [³H] チミジンの取り込み：

各種培養腫瘍細胞の増殖能は、処理24時間時点での [³H] チミジンの細胞への取り込みを指標とした。24穴のプレートに播かれた細胞は10mg/mlのラクトフェリン酵素分解産物で処理され、所定の時間の2時間前に1 μCi/ディッシュ [³H] チミジン（比活性、1 mCi/ml）を加えた。細胞は、1 mlの0.05% SDS、1 mM EDTA（pH、7.2）で溶解後0.1mlの100% TCAを加え、GF/C濾紙に吸着された沈殿の放射活性を計測した。

ヘキスト33258蛍光染色による核染色の観察：

24時間処理細胞を1,500回転、5分間の遠心にて回収後、生細胞を蛍光色素ヘキスト33258にて核染色を行い、蛍光顕微鏡（U領域）にて観察した。

乳酸脱水素酵素（LDH）活性測定による細胞障害：

細胞破壊に伴う乳酸脱水素酵素（LDH）の培地への漏出を、極東LDHテスト試薬（極東製薬工業）を用いて検出し、以下の式に従って細胞障害性を検討した。

1% トリトンX-100にて全ての細胞を溶解したものを陽性対照、0.3% BSA培地のみのもを陰性対照とする。検体、陽性対照、陰性対照の吸光度（560nm）から次式に従って算定した。

細胞障害率 = (検体の吸光度 - 陰性対照の吸光度) / (陽性対照の吸光度 - 陰性対照の吸光度)

DNAの断片化：

24時間処理の細胞をラバーポリースマンを用いて剥離し、全ての細胞を遠心にて回収後、アポトーシスDNAラダー検出キット（WAKO）にてDNA抽出、アガロース電気泳動を行い処理細胞DNAの断片化を観察した。

ERK、p38MAPK、JNKのリン酸化：

1～72時間処理の細胞をホスファターゼ阻害剤を加えた可溶化緩衝液にて可溶化し、リン酸化ERK、リン酸化p38MAPK、リン酸化JNK（NBL社）に対する特異的抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、アルカリホスファターゼ結合ウサギポリクローナル二次抗体を作用させ、ECLウエスタンブロッティングキット（アマーシャムライフサイエンス社、UK）により検出した。

PKCサブタイプの発現量の測定：

PKCサブタイプ遺伝子の発現の変化は、6時間処理の細胞より得られた全RNAに対するRT-PCRにより行った。

PCR Program :

- ・ Denaturation : 94°C、30秒
- ・ Annealing : 58°C、30秒
- ・ Extension : 72°C、60秒
- ・ 30サイクル : PKC α と η
- ・ 35サイクル : PKC ϵ

用いたプライマーの構造

hPKC α

5'-ATCCGCAGTGGAATGAGTCCTTTACAT-3'

5'-TTGGAAGGTTGTTTCCTGTATTCAGAG-3'

hPKC ϵ

5'-TCATCGATCTCTCAGGGTCGTCGG-3'

5'-CGGTTGTCAAATGACAAGGCTTTC-3'

hPKC η

5'-CCATGAAGATGCCACAGGGATCCTAAAATC-3'

5'-AATTCTGGAGACACATAGGAAAAGTTTCTA-3'

(結果／考察)

骨髄巨核芽球性白血病細胞Meg-O1のアポトーシス誘導能を有するラクトフェリン分解物の分離

Meg-O1細胞をラクトフェリン加水分解物で処理すると、急速な形態変化を引き起こした。濃度依存的 (1 ~ 5 mg/ml) な形態変化を生じ、細胞数の減少を引き起こした。ラクトフェリン分解物 (5 mg/ml) で2時間処理した細胞をヘキスト33258による核染色を行ったところ、顕著な核クロマチン分解が観察され、アポトーシスが誘導されていることが示唆された (図1)。また、ラクトフェリン分解物の濃度依存的に細胞外LDH活性の上昇が認められた (図2)。この条件下でのMeg-O1細胞死は、DNAアーゼ阻害剤の塩化亜鉛添加により濃度依存的に阻害された (図3)。また一般に、アポトーシス誘導時には、カスパーゼが活性化されることが知られており、カスパーゼ3の阻害剤 (ZVED、DEVD) で前処理することにより、LDHの遊出が部分的に阻害された (図4)。この結果により、ラクトフェリン分解物はMeg-O1のアポトーシスを誘導し、核DNAの分解による細胞死をもたらすことが示めされた。

ラクトフェリン分解物の活性成分を明らかにするために、分子量3000の膜を用いて分画したものを、セファデックスG50カラムクロマトグラフィーによりさらに数十画分に分画した。各画分について、Meg-O1に対するLDH遊離活性を測定したところ、二つの活性画分が分離された (図5)。それぞれの活性画分を集めて濃縮したサンプル (LF1、LF2) について、各種細胞に作用させ、細胞増殖、分化、

アポトーシス誘導、および細胞内シグナル伝達系の影響について検討した。

骨髄巨核芽球性白血病細胞Meg-O1に対するラクトフェリン分解物の影響

ラクトフェリン分解物 (LF1、LF2) および未分解ラクトフェリン (LFW) について、Meg-O1の細胞内シグナル伝達系 (PLC、PLD、MAPキナーゼ) の影響を検討した。LF1、LF2は濃度依存的 (0.2 mg/ml) にPLCの活性化を引き起こし、LFWの約100分の1の低濃度でも活性化が認められた (図6)。さらに、LF1 (0.2mg/ml) は他の増殖因子による刺激 (ホルボールミリステイトアセテイト (PMA)、スフィンゴシン1-リン酸 (Spp)、トロンビン) に比べて著しくPLDの活性化を引き起こしたが、LF2の作用は弱かった (図7)。LF1 (0.2mg/ml) によるPLDの活性化は、30分以内で起こり、チロシンキナーゼ阻害剤 (ゲニスタイン、ST638) や細胞外カルシウムキレート剤 (EGTA) 処理により強く阻害された (図8)。従って、Meg-O1細胞では、LF1によるPLDの活性化は、カルシウム上昇によるチロシンキナーゼの活性化を介して起こることが示唆された。さらに、細胞増殖に関連するMAPキナーゼファミリーのERKは、LF1 (0.2mg/ml) 処理後約10分をピークに活性化された (図9)。以上の結果により、ラクトフェリン分解物LF1は、低濃度で細胞増殖シグナル (PLC、PLD、ERK) を活性化して、細胞増殖を引き起こすことが示唆された。

骨芽様細胞MC3T3-E1におけるラクトフェリン分解物による増殖、分化シグナル伝達系の影響

ラクトフェリン分解物の骨芽様細胞MC3T3-E1の増殖および分化誘導作用について検討した。

ラクトフェリン分解物の細胞増殖に対する影響を検討するために、MC3T3-E1細胞にラクトフェリン分解ペプチドを添加し、 $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞への取り込みの時間経過を調べた。LF2は1 mg/mlでは阻害の程度は僅かであるが、5 mg/mlで24時間処理すると $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを阻害した (図10)。阻害の程度はFBSの濃度に依存して減少し、10%FBS存在下ではLF2 (5 mg/ml) による阻害の程度は弱いですが、低濃度FBS (1%) 培地では完全に阻害した。したがって、LF2は骨芽細胞の増殖を抑制する効果があることが示された。

一方、MC3T3-E1細胞は骨への分化に伴い、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性が増加することが知られている。LF2のMC3T3-E1細胞の骨への分化誘導能について調べた。LF2 (5 mg/ml) を1% FBS培地に添加し、ALP活性を測定した。対照細胞は、1%FBS培地で48時間培養するとアルカリホスファターゼ活性が約2倍に増加するが、ラクトフェリン加水分解ペプチド処理により、活性の低下が認められた (図11)。したがって、ラクトフェリン加水分解ペプチドはMC3T3-E1細胞の骨への分化誘導を阻害するものと思われる。ラクトフェリン加水分解ペプチドによる蛋白質チロシンリン酸化の影響を調べるために、LF2 (5 mg/ml) を無血清培地で24時間培養後、抗ホスホチロシン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。無血清培地で24時間培養することにより幾つかの蛋白質のチロシンリン酸化が認められた (60kDa、70kDa、88kDa、100kDa、125kDa、130kDa) (図12)。LF2で処理することにより、88kDa、55kDa、58kDa、100kDa蛋白質のチロシンリン酸化の増加が認められ、逆

に125kDaと70kDa蛋白質のチロシンリン酸化の減少が観察された。125kDa蛋白質バンドはFAKの可能性が考えられ、細胞接着の阻害と関連していることが示唆された。MC3T3-E1細胞のLF2処理によるプロテインキナーゼC (PKC) の変動について、各種PKCアイソザイムの抗体を用いてウエスタンブロットティングと、RT-PCRによるmRNAの変動について検討した。MC3T3-E1細胞には各種PKCアイソザイムが存在し、PKC α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 θ が検出された (図13)。LF2で24時間処理することによりPKC ϵ の蛋白質レベルおよびmRNAレベルでの特異的な減少が観察された。MAPKファミリーの活性化は、ERK、p38MAPK、JNKの活性化型のみを検出する抗体を用いて検討した。無血清培地で24時間培養した対照細胞では、ERKとp38MAPKのチロシンリン酸化の亢進が見られたが、LF2処理細胞では両者のリン酸化は完全に消失していた (図14)。

以上の結果により、ラクトフェリン加水分解産物は骨芽様細胞MC3T3-E1細胞の増殖および分化誘導を低下させることが示された。また、増殖阻害はMAPKファミリーのERK1 (p42MAPK) の活性化の阻害とPKC ϵ の特異的減少が関連しているものと思われる。

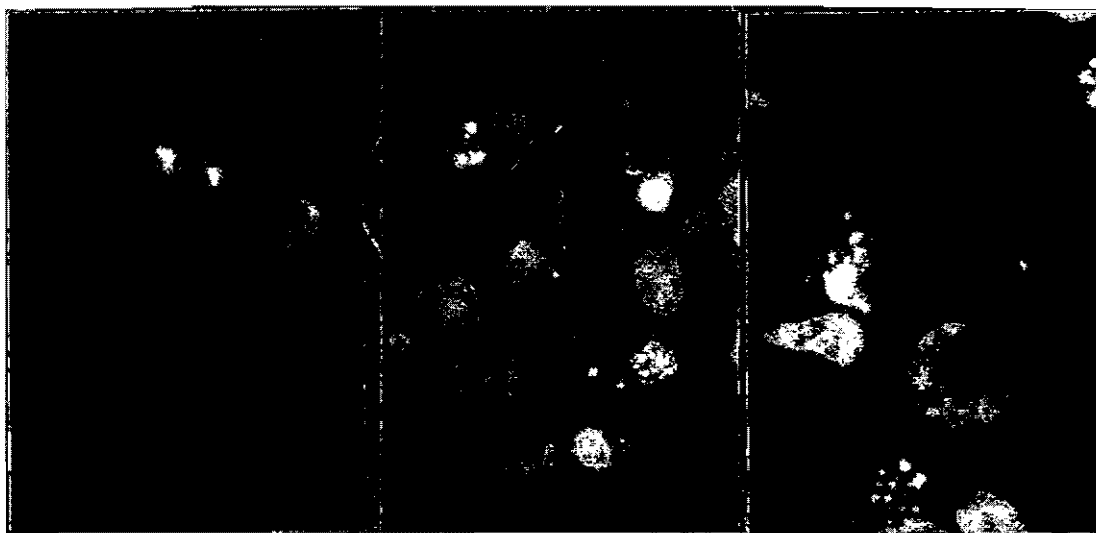
ラクトフェリン酵素分解産物による培養腫瘍細胞への増殖抑制、アポトーシス誘導作用

ラクトフェリンのペプシン分解産物が固形ガン、特に口腔外科領域で多い扁平上皮ガン、および骨肉腫由来の培養細胞 (SAS、HSC-4: ヒト舌扁平上皮ガン、UMR-106: ラット骨肉腫) に及ぼす作用を検討した。

ラクトフェリンのペプシン分解産物LF2を各種ガン細胞SAS、HSC-4、UM-106-01に作用させ、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みに対する影響を検討した。LF2は濃度依存的にHSC細胞への $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを完全に抑制した (図15)。一方、LF2はSASやUM-106-01細胞に対する $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みの影響は弱かった。細胞からのLDHの遊出を検討してきたところ、LF2はSASに対して濃度依存的な強い増加を示したが、UM-106-01やHSC細胞に対する作用は弱かった (図16)。これらの細胞をLF2 (2 mg/ml) で24時間処理し、ヘキスト33342蛍光染色で各クロマチンの変化を観察した。いずれのガン細胞も顕著な核の断片化が見られた (図17)。また、アガロース電気泳動によりDNA断片化の程度を測定したところ、LF2 (2 mg/ml) の処理時間に依存してDNA断片化の増加が観察され (図18)、アポトーシスが誘導されていると考えられた。LF2処理による、MAPキナーゼの影響を検討した。LF2 (2 mg/ml) でHSC細胞を処理すると、ERKおよびJNKの血清刺激によるチロシンリン酸化を延長させ、また、単独でERKのリン酸化を亢進させた (図19)。また、LF2はPKCの ϵ 、 η サブタイプのmRNA発現を減少させた (図20)。以上の結果から、ラクトフェリン分解物は固形ガン細胞のアポトーシスを誘導して、増殖に関連するMAPK細胞を死にもたらしことが明らかにされた。

以上の結果から、ラクトフェリンのペプシン分解ペプチドは、各種細胞に対して高濃度では、増殖、分化抑制、アポトーシス誘導を引き起こし、増殖に関係する細胞内シグナル伝達系の活性化や遺伝子の発現、蛋白質発現を阻害し、細胞死を引き起こすことが明らかにされた。一方、低濃度の短時間処理では、増殖シグナルの活性化を引き起こすことが示唆された。今後は、分解産物中の増殖、分化、

アポトーシスに関係するそれぞれのペプチドを分離精製し、それらの構造解析を行い、臨床応用として病態との関連性についてさらに検討したい。



対照 ラクトフェリン分解物 (2mg/ml)、6時間処理

図1 ラクトフェリン分解物によるMeg-O1のアポトーシス誘導
ヘキスト33258による核染色の蛍光顕微鏡像

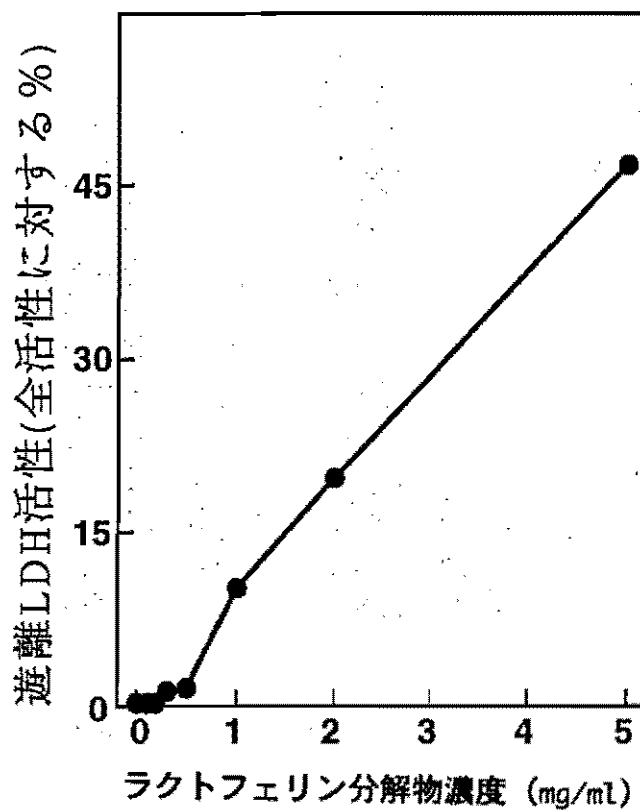


図2 Meg-O1のLDH遊離に対するラクトフェリン分解物の濃度依存性

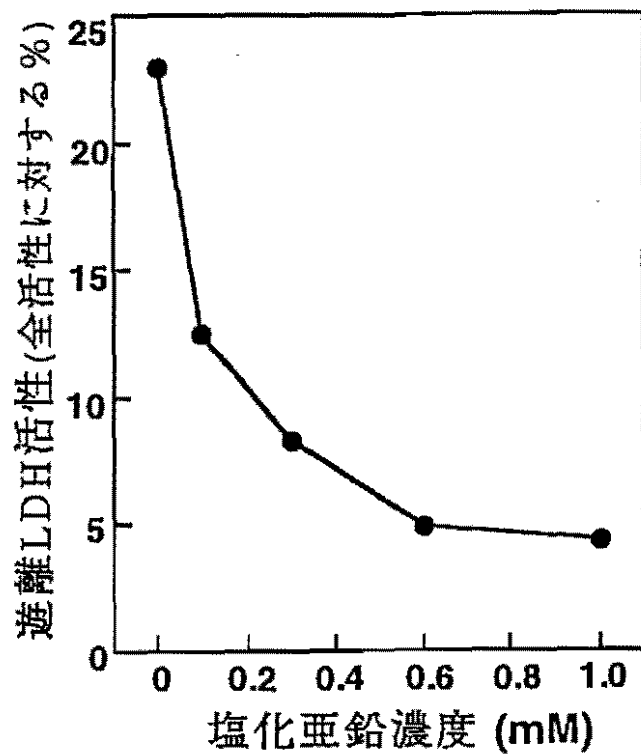


図3 ラクトフェリン分解物によるMeg-O1のLDH遊離に対する塩化亜鉛の濃度依存的阻害

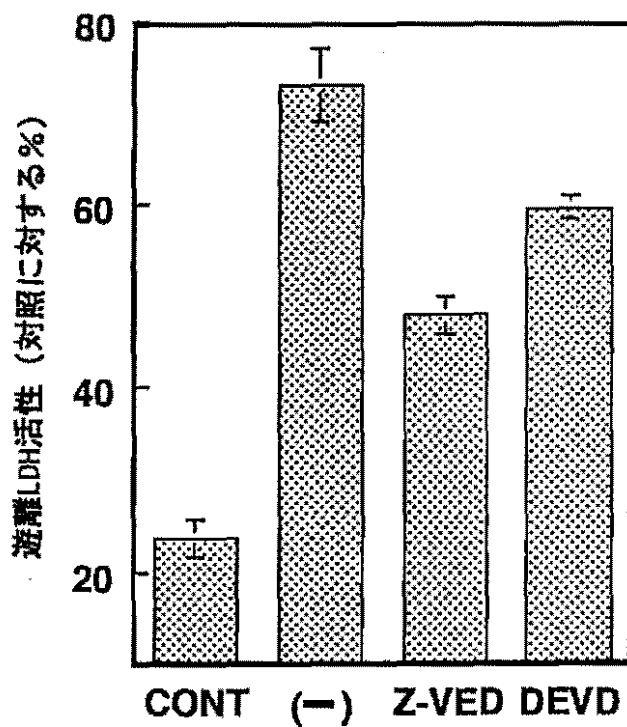


図4 ラクトフェリン分解物によるMeg-O1のLDH遊離に対するカスパーゼ阻害剤の影響

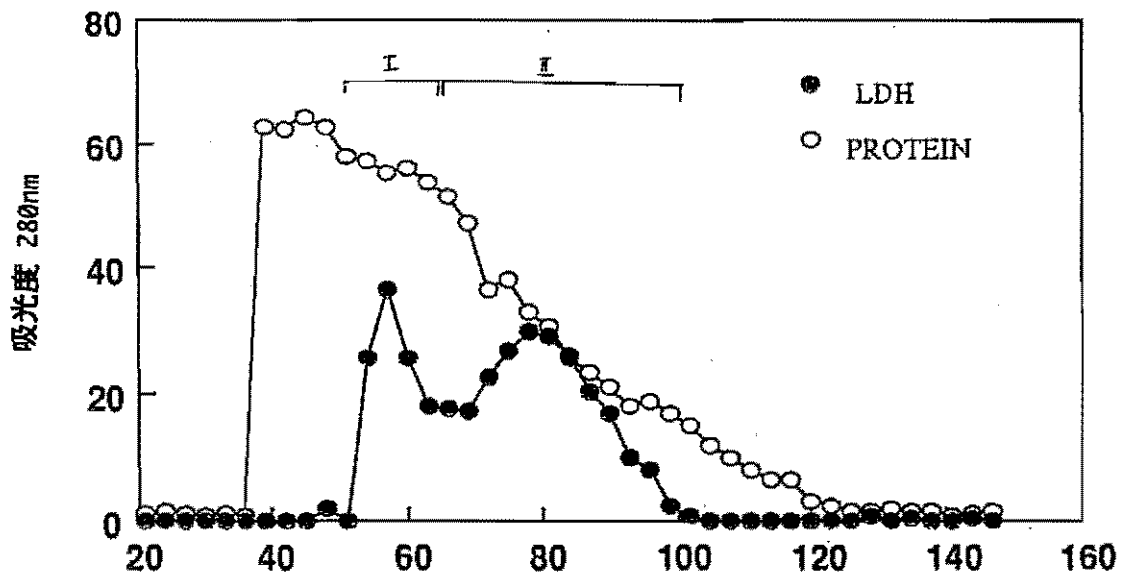


図5 ラクトフェリン分解物のセファデックスG50によるカラムクロマトグラフィー

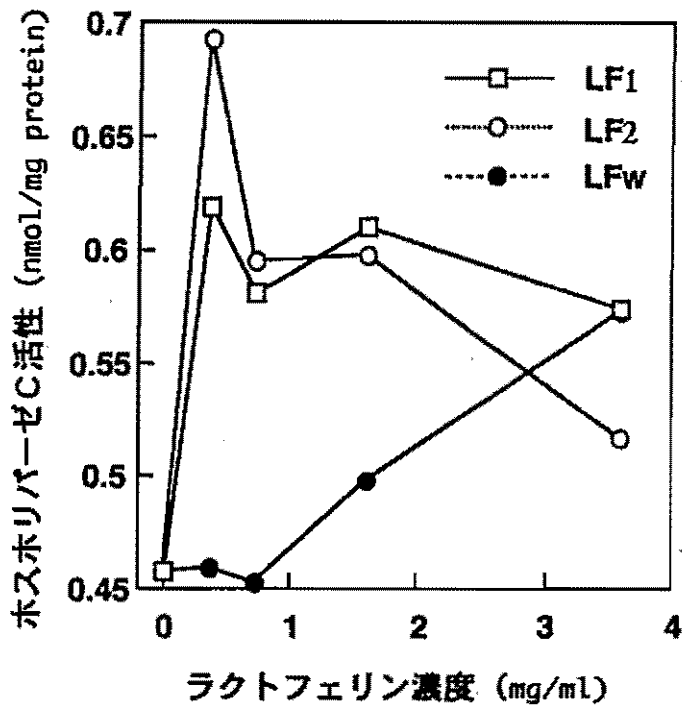


図6 ラクトフェリン分解物の濃度依存的なMeg-O1のホスホリパーゼC活性化

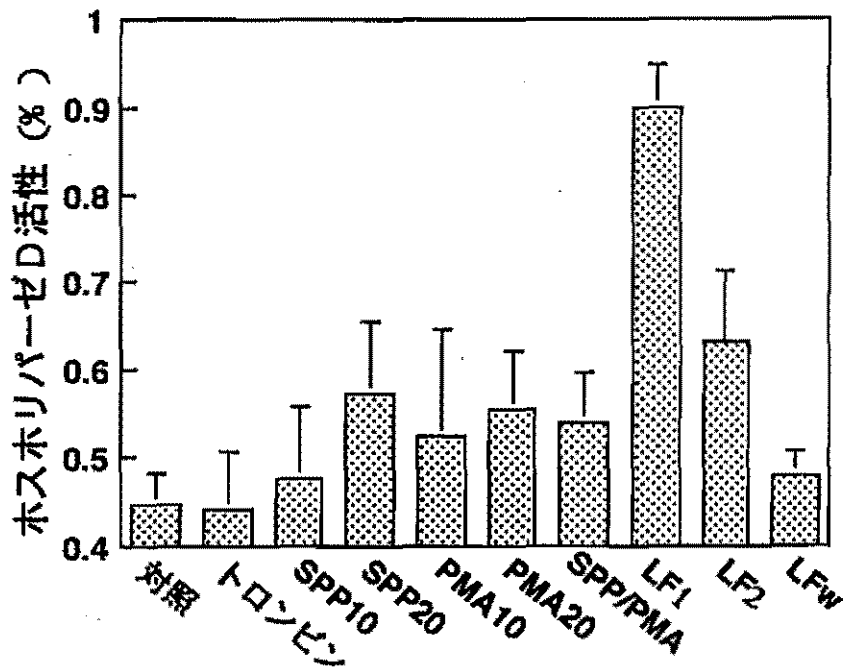


図7 各種増殖因子とラクトフェリンによるMeg-O1のホスホリパーゼDの活性化

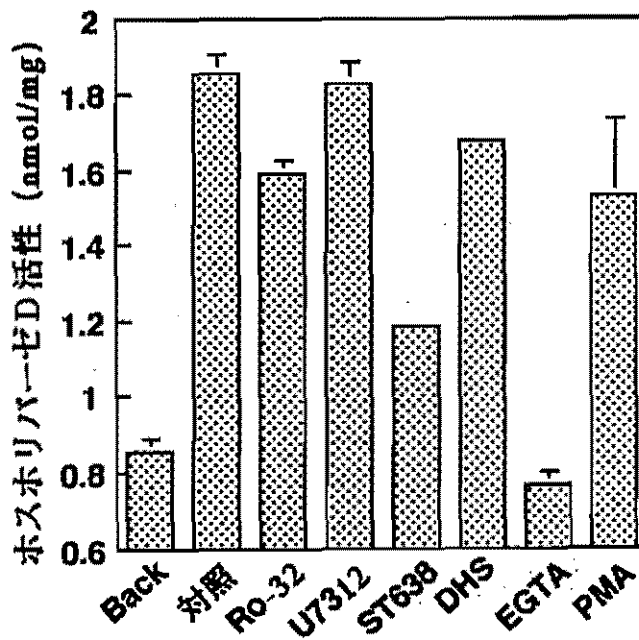
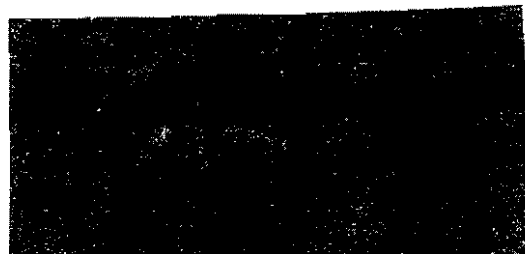


図8 LF1によるMeg-O1のホスホリパーゼD活性化に対する各種阻害剤の影響

Ro-32、プロテインキナーゼC阻害剤；U7312、PLC阻害剤；ST638、チロシンキナーゼ阻害剤；DHS、スフィンゴシンキナーゼ阻害剤；EGTA、カルシウムキレート；PMA、プロテインキナーゼC活性化

MAPキナーゼ →



0 2 5 10 20 30 (分)

図9 LF1による経時的なMeg-O1MAPキナーゼの活性化

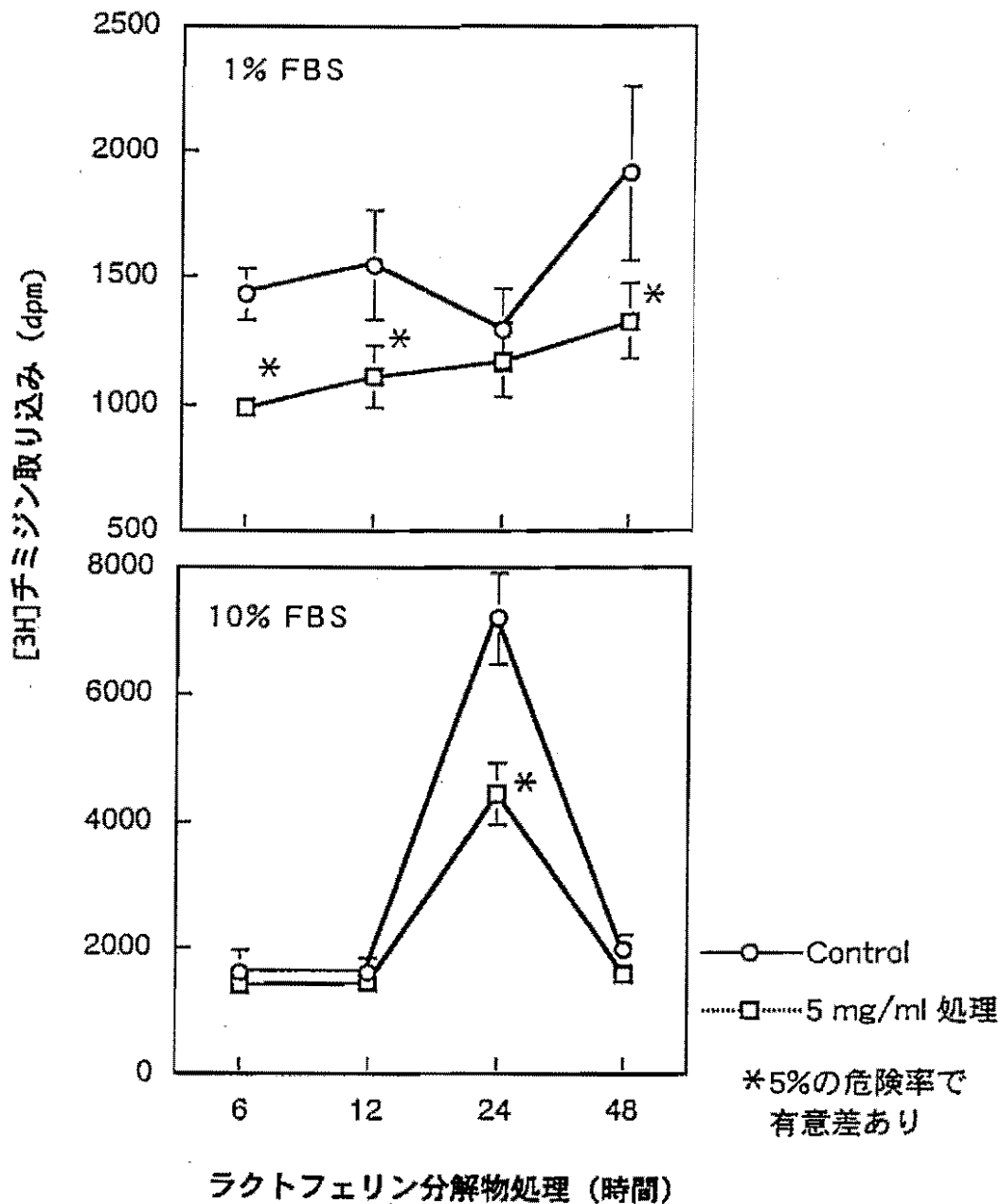


図10 MC3T3細胞の³Hチミジン取り込みに対するラクトフェリン分解物による阻害

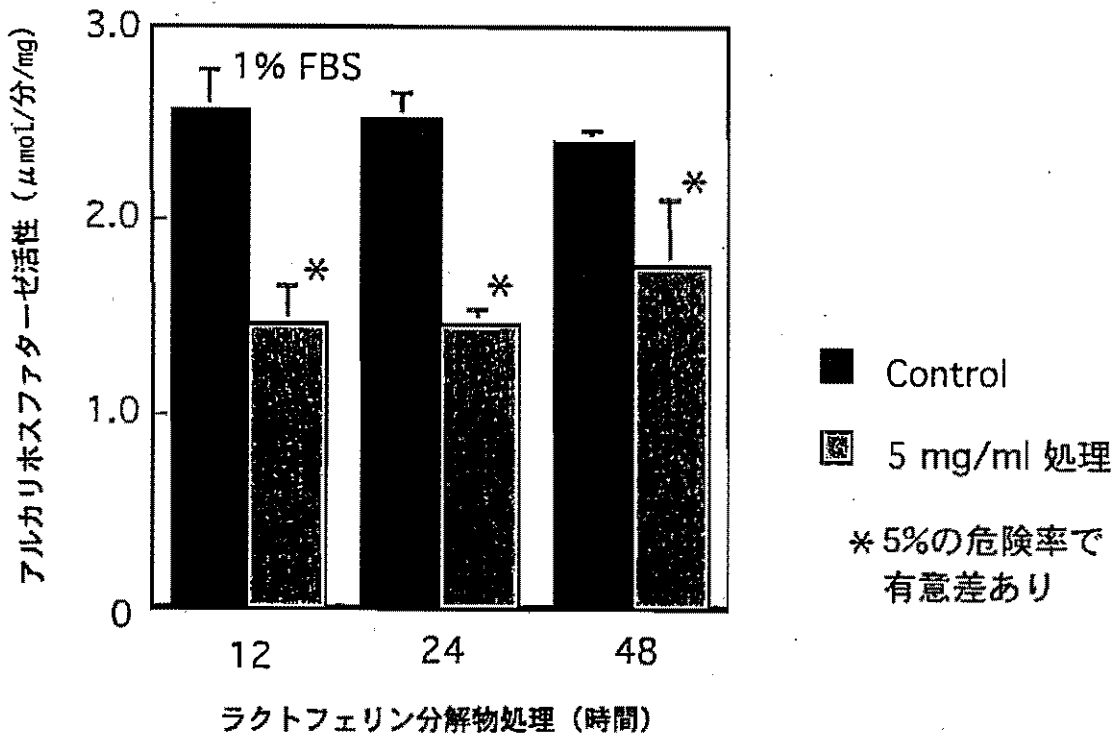


図11 MC3T3細胞のアルカリホスファターゼ活性に対するラクトフェリン分解物処理の影響

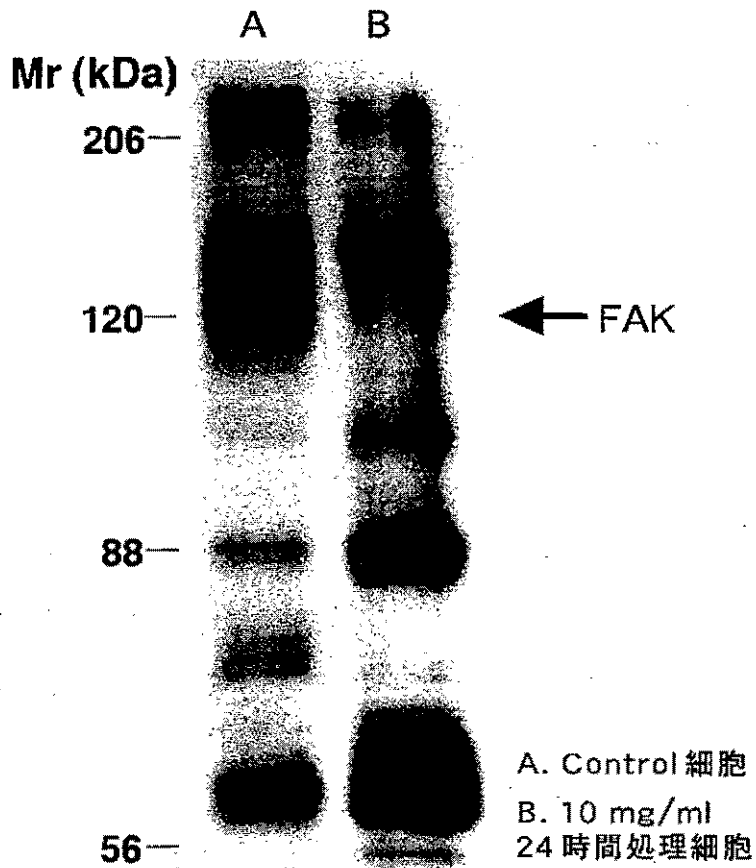


図12 MC3T3細胞のチロシンリン酸化に対するラクトフェリン分解物の影響

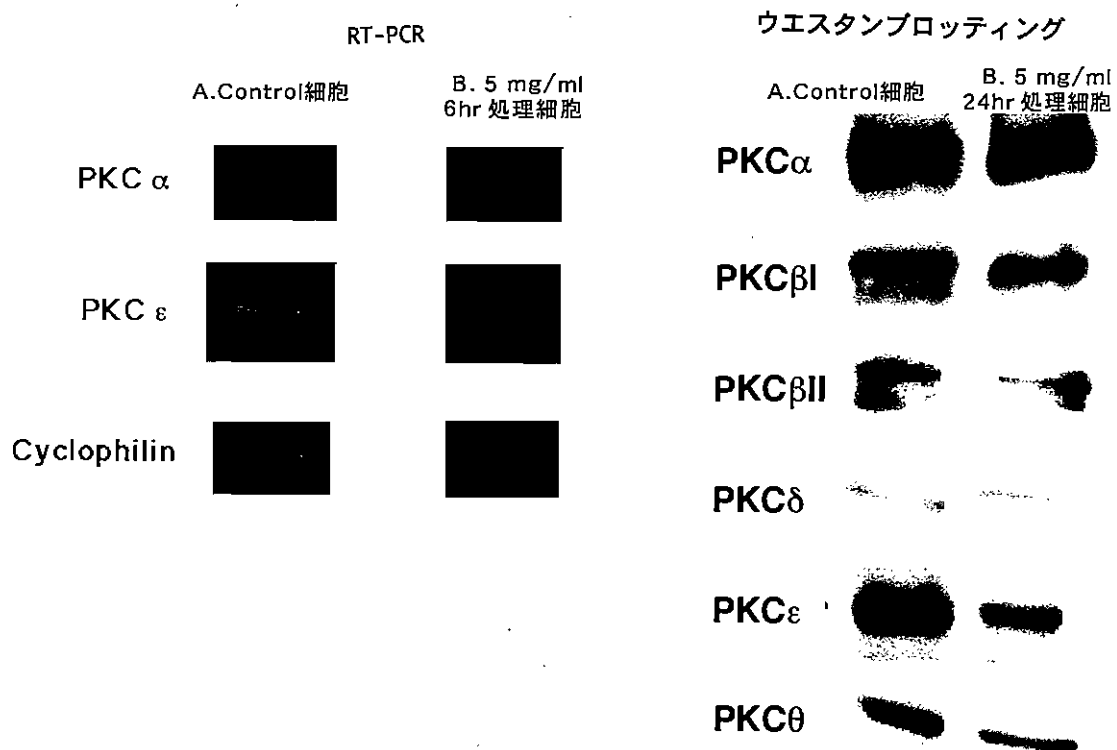


図13 MC3T3細胞のプロテインキナーゼCに対するラクトフェリン分解物の影響

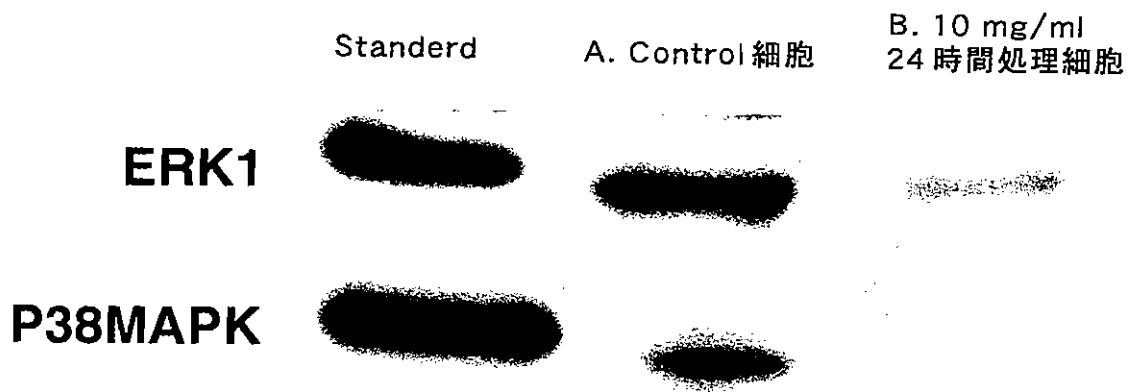


図14 MC3T3細胞のMAPキナーゼ活性化に対するラクトフェリン分解物の影響

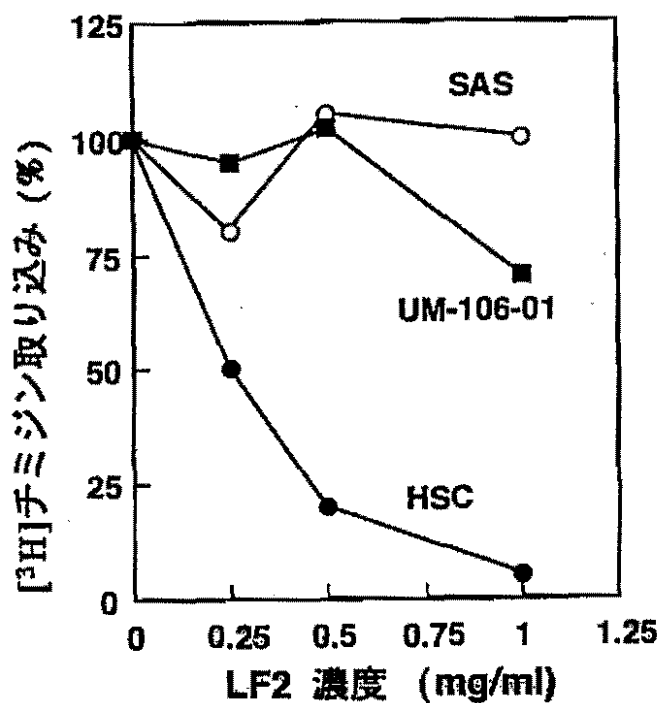


図15 ガン細胞における [³H] チミジン取り込みに対するラクトフェリン分解物の影響

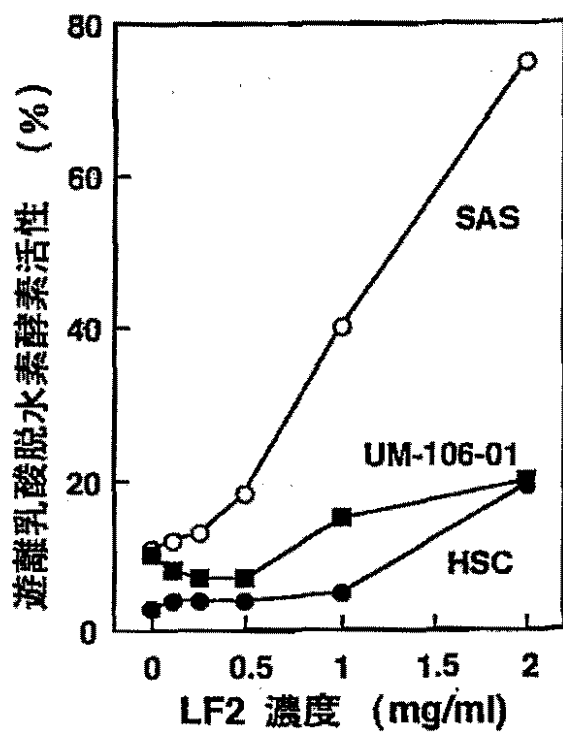
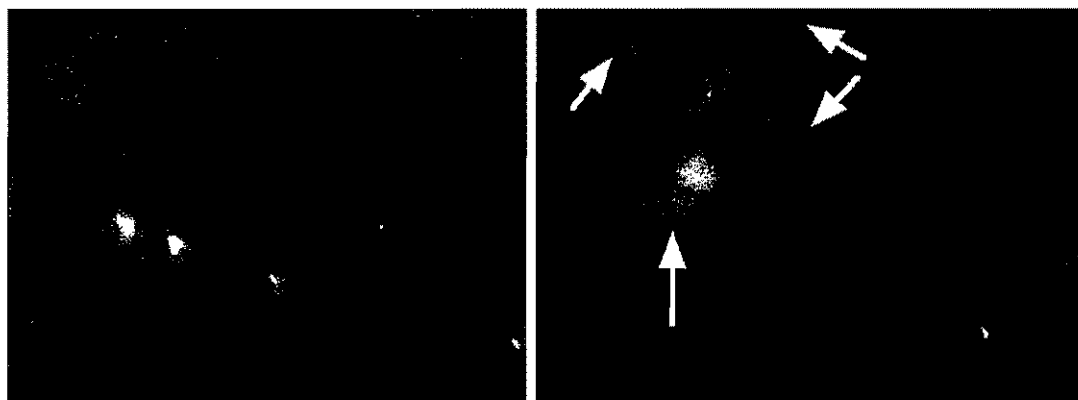
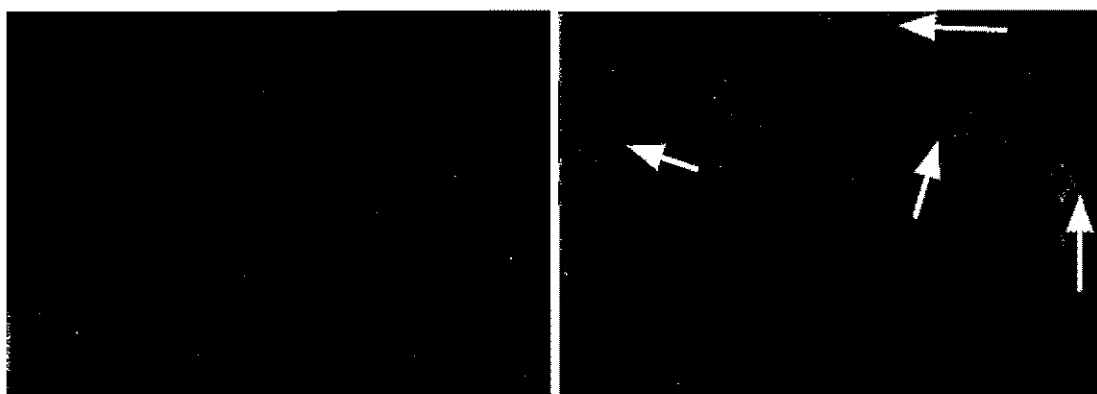


図16 ガン細胞における遊離乳酸脱水酵素活性に対するラクトフェリン分解物の影響

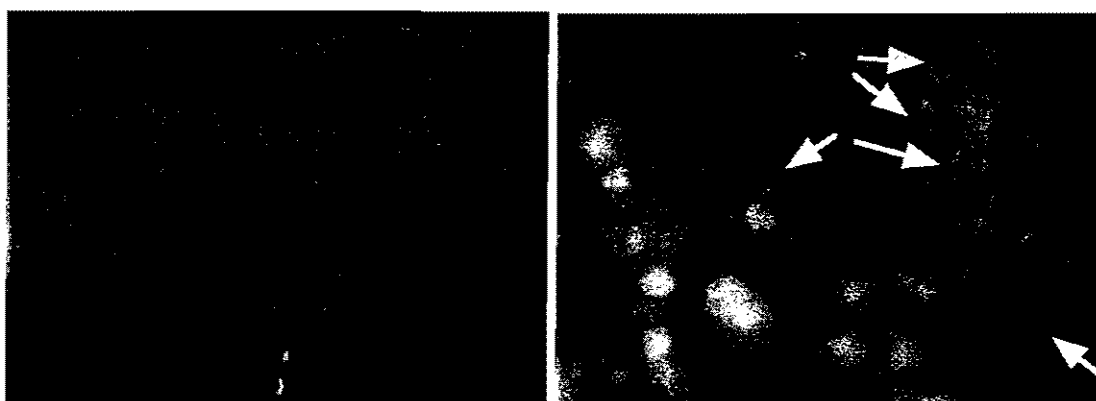
Human squamous cell carcinoma cell, HSC-4



Human squamous cell carcinoma cell, SAS



Rat Osteosarcoma cell, UMR-106-01



未処理 UMR-106-01 細胞 (x400)

2 mg/ml, 24 時間処理 UMR-106-01 細胞 (x400)
核の矮小化, クロマチンの凝集像が見られる

図17 ガン細胞のラクトフェリン分解産物処理による核変化ヘキスト33258を用いた核クロマチン染色の蛍光顕微鏡像

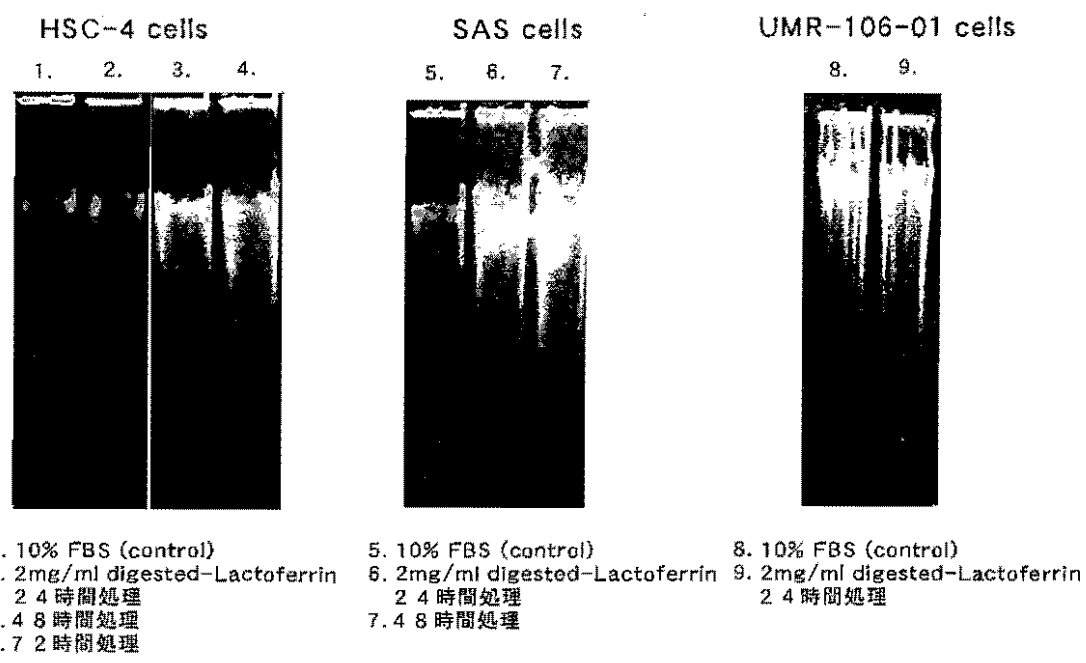


図18 ガン細胞のラクトフェリン分解産物処理による核DNAの断片化アガロースゲル電気泳動

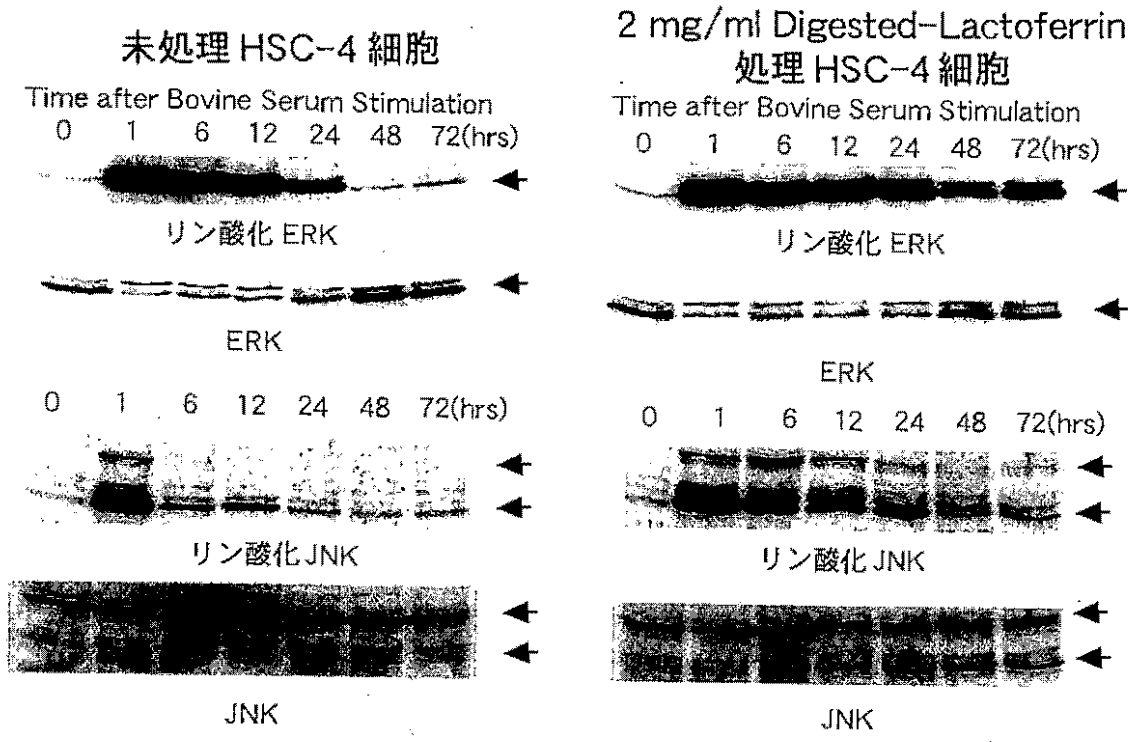


図19 HSC-4細胞のラクトフェリン分解産物処理によるMAPキナーゼ (ERK、JNK) の活性化への影響

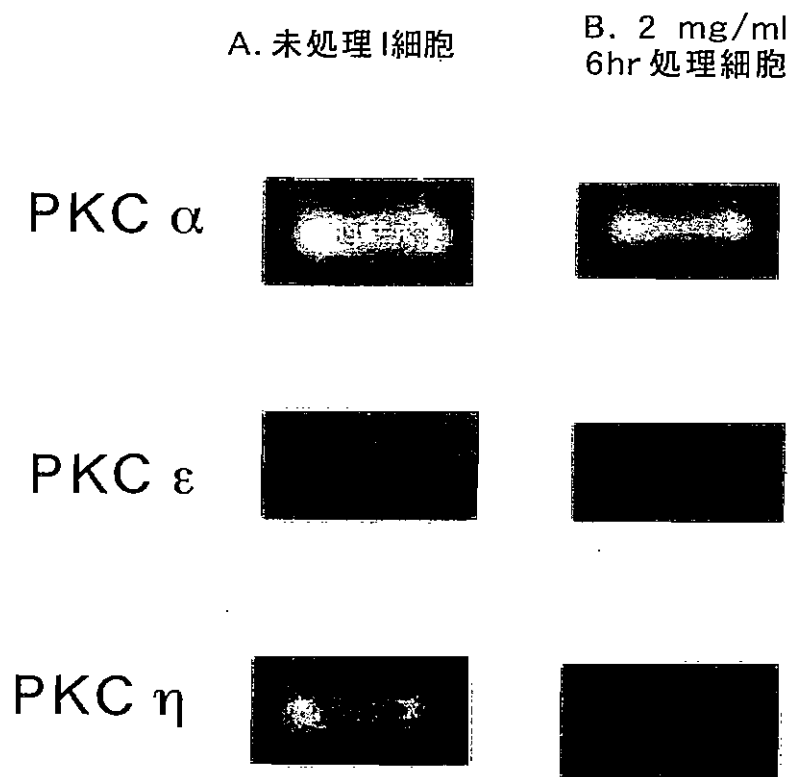


図20 HSC-4細胞のラクトフェリン分解産物処理によるプロテインキナーゼCmRNA発現への影響
RT-PCRを用いて行った