

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻

平成 15 年度博士課程 進学

氏 名 生見 尚子

指導教員名 東條 英昭

論文題目 乳清酸性タンパク質の乳腺細胞に対する分子制御機構

乳清酸性タンパク質(Whey acidic protein: WAP)は、齧歯類、有袋類、ラクダ、ブタなどの乳汁中に同定された乳清タンパク質であり、その mRNA の発現は妊娠中期から泌乳中期に乳腺胞上皮細胞に特異的に認められ、非妊娠期と比較して約 1000 倍に上昇する。WAP は、4-DSC からなる WAP ドメインを2つもち、立体構造がセリンプロテアーゼインヒビター様であるため何らかの生物学的機能をもつと考えられてきたが、その機能解析は *in vivo* によるものだけであった。WAP を全身性で恒常的に発現するトランスジェニック (CAG/WAP-Tg)マウスや乳腺胞においてのみ過剰発現する WAP/WAP -Tg ならびに MMTV/WAP-Tg マウスでは、乳腺胞の発達が抑制され、その結果、産仔の発達遅延が報告されている。これらの結果は、WAP が乳腺の発達を制御する一因子であることを強く示唆している。以上のような背景から、本研究は、細胞培養系を用いて乳腺細胞の増殖や分化、さらに乳癌細胞の増殖や浸潤に作用する WAP の分子制御機構を明らかにしたものである。

第一章 乳腺上皮細胞の細胞増殖における WAP の機能

WAP が、*in vivo* での結果と同様に細胞培養系においても乳腺細胞の増殖を抑制するのかを調べるために、まず、マウス妊娠期乳腺由来上皮細胞株(HC11)と非乳腺細胞であるマウス線維芽細胞株(NIH-3T3)に pCX/WAP 遺伝子を導入し恒常的に WAP を発現するクローン株(WAP 株)を樹立した。細胞増殖能を測定した結果、HC11 株のみで、WAP 株が野生株より有意に増殖が抑制された。さらに、WAP を含む培養液で HC11 野生株を培養した場合にも増殖が抑制され、また WAP が細胞膜周辺に局在することが免疫染色法により確認された。これらの結果から、WAP は乳腺上皮細胞に対し特異的に作用し細胞増殖を抑制することが示された。一般に細胞増殖抑制の要因としては、ネクローシス、アポトーシスあるいは細胞周期の遅延の3通りが推定される。そこで WAP 発現株の細胞形態を観察したところネクローシスではないことが示唆された。つぎに、アポトーシスと細胞周期に対する WAP 発現の影響を調べるため、BrdU の取り込み率の測定と FACS による解析を行った。その結果、WAP 発現株ではアポトーシスの顕著な変化はみられず、一方 G1 期細胞の増加と S 期細胞群の減少がみられたことから、WAP が G1 期から S 期への移行を遅延させることが示唆された。そこで G1/S 期移行を制御する cyclin D および E 群の mRNA の発現量とタンパク質量を、半定量的 RT-PCR 及び Western Blot で調べた結果、WAP 発現株は野生株に比べて cyclin D1 の mRNA 量及びタンパク質量が有意に減少していた。

以上の結果から、WAP は、乳腺上皮細胞において、細胞外からオートクライン及びパラクライニ的に細胞膜周辺で作用し、cyclin D1 の発現抑制を介して細胞増殖を抑制することが明らかになった。また、マウス(MMT)およびヒト(MCF-7, MDA-MB-453)の乳癌細胞株においても、同様に WAP の発現が cyclin D1 の発現量の減少を介して細胞増殖を抑制した。さらに、WAP-MCF-7 株と mock-MCF-7 株をヌードマウスの皮下に注入し、その後の腫瘍形成能を測定したところ、WAP 発現株の腫瘍発達が有意に抑制され、また、血管新生因子の発現においても抑制傾向がみられた。

第二章 細胞外マトリックス(ECM)の分解における WAP の機能

細胞は通常、隣接する細胞あるいは細胞外マトリックス(Extracellular matrix: ECM)に接しており、ECM の分解は細胞の増殖や分化、さらに、癌細胞の浸潤や転移などを制御している。ECM を分解するプロテアーゼはセリンプロテアーゼとマトリックスメタロプロテアーゼの2種類に大別され、WAP はセリンプロテアーゼインヒビター様であることから、ECM の分解を抑制している可能性が推察される。また、第一章の結果から WAP が、非乳腺細胞の細胞膜周辺には局在せず、乳

腺上皮細胞の細胞膜周辺に局在し、細胞内へ取り込まれずに作用することが示唆されている。そこで、本章では ECM 分解に対する WAP の作用を調べた。WAP-HC11 株と mock-HC11 株の細胞当たりの ECM 量を測定したところ、WAP 株では ECM の蓄積量の増加がみられ、トリプシンによる細胞分離に要する時間が有意に増加した。そこで、WAP が作用する ECM の成分を同定するために、ECM の構成物である collagen I, III, IV, gelatin, laminin をそれぞれ塗布した培養用シャーレ上で細胞を培養したところ、WAP 発現株は laminin 上でのみ顕著に増殖が抑制された。また、WAP 発現株の培養上清液に未分解の laminin が多く存在し、ECM 中に laminin が多く蓄積していることが免疫染色法で確認された。Laminin の分解は、HC11 細胞が機能的分化能を獲得する上で必須条件であることが報告されている。そこで、ラクトジェニックホルモン応答性について乳腺の分化マーカーである β -casein の発現誘導を定量することにより検討した結果、WAP-HC11 株は mock-HC11 株よりも顕著に分化が抑制された。一方、乳癌細胞では、laminin の分解は浸潤において必須の過程である。そこで、浸潤の擬似的環境として Boyden chamber の膜上に基底膜成分であるマトリゲルを塗布し WAP-および mock-MCF-7 株を培養し、膜を通過し下層シャーレに接着した細胞数を計測した。その結果、WAP 発現株の浸潤細胞数は mock 株の約 1/5 であり、また、マトリゲル内の残存 laminin 量が多かった。そこで、laminin 分解活性をもつ 3 種のセリンプロテアーゼに対する WAP の阻害作用を検討した結果、WAP は laminin 分解において膵臓エラスターゼに対して特異的に阻害作用を示し、好中球エラスターゼやトリプシンのプロテアーゼ活性に対する影響を示さなかった。さらに、培養上清液中の膵臓エラスターゼ活性を特異的基質を用いて定量したところ、HC11 株が膵臓エラスターゼ活性を示すタンパク質を産生すること、また、WAP-HC11 株は、mock-HC11 株よりもエラスターゼ活性が有意に減少していることが示された。

以上の結果から、WAP は乳腺上皮細胞が産生する膵臓エラスターゼ型セリンプロテアーゼの活性を抑制することにより laminin の分解を抑制し、その結果、乳腺上皮細胞の増殖および分化、さらに、乳癌細胞の増殖や浸潤を抑制することが示唆された。

第三章 MAPK の活性化における WAP の機能

Laminin などの ECM 成分が分解されると、ECM の構成が変化し、ECM 中に捕捉されていた増殖因子が遊離して増殖因子受容体を活性化し細胞増殖を促すことが報告されている。また、増殖因子により活性化される MAPK である ERK1/2 のリン酸化は cyclin D1 の発現を誘導することが報告されている。そこで、第三章では、laminin 分解による MAPK カスケードの活性化に対する WAP

の関与を調べた。膵臓エラスターゼを mock-HC11 株に添加すると、添加量依存的に細胞増殖能を促進したが、WAP-HC11 株では細胞増殖の促進が認められなかった。また、mock-HC11 株および WAP-HC11 株に膵臓エラスターゼの特異的阻害剤であるエラスターゼインヒビター I を添加したところ、細胞増殖が抑制された。このことから、膵臓エラスターゼ型セリンプロテアーゼが乳腺細胞の増殖を促進し、そのインヒビターである WAP が細胞増殖を抑制する機構が推察された。つぎに、MAPK の活性化に対する膵臓エラスターゼの関与を調べたところ、mock-HC11 株では膵臓エラスターゼ添加後 30-120 分に ERK1/2 のリン酸化が検出されたが、WAP-HC11 株ではそのリン酸化が僅少であった。また、EGFR (epidermal growth factor receptor; 上皮増殖因子受容体)の活性化阻害剤 AG1478 を用いた実験により、膵臓エラスターゼは EGFR の活性化を介して ERK1/2 のリン酸化を誘導することが示唆された。さらに、EGF 無添加の培養で検出された WAP-HC11 株の細胞増殖抑制作用は、EGF を添加することにより回復した。

以上の結果から、HC11 株では膵臓エラスターゼ型セリンプロテアーゼが、EGFR の活性化を介して ERK の活性化を誘導し細胞増殖を制御していると推測され、WAP はプロテアーゼ活性を抑制することにより、MAPK の活性化を抑制し、cyclin D1 の発現を抑制して細胞増殖を抑制していることが示唆された。

本研究により、以下に示す WAP の乳腺細胞に対する分子作用機構が示唆された。

正常乳腺上皮細胞において、WAP は、乳腺上皮細胞に特異的に結合し、ECM 中の laminin を分解する膵臓エラスターゼ型セリンプロテアーゼの活性を阻害する。Laminin 分解の阻害は ECM 形態の変化による EGF の放出を抑制し、EGFR の活性化を介する ERK1/2 の活性化を抑制する。その結果、cyclin D1 の発現が抑制され、G1/S 期移行が遅延し、細胞増殖が抑制される。また、WAP による laminin の蓄積により、最終分化能の獲得が阻害される。一方、乳癌細胞においては、WAP は、上述の機構と同様に細胞増殖ならびに腫瘍形成能が抑制され、さらに laminin の分解による癌細胞の浸潤が顕著に抑制される。

以上、WAP の分子作用機構が明らかになり、乳腺において、WAP が分化した乳腺上皮細胞から分泌され、周辺の増殖中の乳腺上皮細胞を制御することにより乳腺の発達を統率していると考えられる。さらに、乳腺上皮細胞が分化を逸脱した場合にその増殖を抑制する重要な因子として作用していることが推察される。