

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 生見 尚子

乳清酸性タンパク質(Whey acidic protein: WAP)は、齧歯類やブタなどの乳汁中に同定された乳清タンパク質である。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。WAPを乳腺で過剰発現するトランスジェニック動物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、WAPが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分子制御機構を明らかにする目的で行ったものである。

第1章では、細胞培養系を用いてWAPの乳腺細胞の増殖抑制を調べた。まず、マウス腺胞由来上皮細胞株(HC11)と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細胞のみで、WAP株が野生株より有意に増殖が抑制された。FACSscanによる解析の結果、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、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及びウエスタン法で調べた結果、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。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、ヌードマウスを用いた実験から、WAPが腫瘍形成能を有意に抑制することが判明した。

WAPがセリンプロテアーゼインヒビター様タンパク質であることから、第2章では、ECM分解に対するWAPの作用を調べた。WAP-HC11株ではECMの蓄積量の増加がみられた。そこで、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上でのみで顕著に増殖が抑制された。また、WAP発現株の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。さらに、WAP-HC11株は分化が顕著に抑制されていることが判明した。一方、乳癌細胞による浸潤実験で、WAP発現株の浸潤細胞数は顕著に減少し、また、マトリゲル内の残存laminin量が多かった。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た。以上の結果から、WAPは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。

ECM成分が分解されると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膜エラスターゼの関与を調べた。その結果、WAP-HC11 株では ERK1/2 のリン酸化が僅少であった。また、EGFR (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、膜エラスターゼは 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。

以上、本研究から、WAP の分子作用機構が明らかになり、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制御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た。以上本研究の成果は、学術上貢献するところが少なくない。

よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。