

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450413

研究課題名(和文)腫瘍性血管新生に対するウシラクトフェリンの阻害機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of inhibitory mechanisms of bovine lactoferrin for tumor-induced angiogenesis.

研究代表者

高山 喜晴 (Yoshiharu, Takayama)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門 畜産物研究領域・上級研究員

研究者番号：00343989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウシラクトフェリンの血管新生阻害効果は主にCローブ断片が担っていることが明らかになった。また、ウシラクトフェリンはCXCR4含有リガ粒子と相互作用することが明らかになった。CXCR4発現細胞をラクトフェリンで刺激した場合、SDF-1刺激による受容体活性化の指標であるCXCR4の二量体化・ユビキチン化・チロシンリン酸化が同様に認められ、CXCR4がラクトフェリン受容体として機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify the region of bovine lactoferrin that is responsible for suppression of tumor-induced angiogenesis, we compared the effect of lactoferrin fragments on VEGF-induced angiogenesis. C-lobe fragment of bovine lactoferrin was more potent inhibitor for angiogenesis. Bovine lactoferrin interacted with CXCR4-containing lipoparticle. Lactoferrin stimulation mimicked many aspects of SDF-1-induced CXCR4 modification, including receptor dimerization, tyrosine phosphorylation, and ubiquitination, suggesting that CXCR4 acts as a lactoferrin receptor.

研究分野：生化学・細胞生物学

キーワード：タンパク質 農林水産物 細胞・組織 受容体 ラクトフェリン

## 1. 研究開始当初の背景

ラクトフェリンは乳を始めとする外分泌液中に多く含まれる糖タンパク質である。N-ローブ・C-ローブと呼ばれる球状のドメインがポリペプチドで連結された構造を持ち、各ローブが1分子の鉄イオンと強固に結合する。ラクトフェリンは、細菌の生育に必要な鉄をキレートすることから、強力な抗菌活性を示し、自然免疫による生体防御に寄与している。一方、近年になり、ラクトフェリンの哺乳類細胞に対する直接的な機能が報告されている。その一つが抗腫瘍活性であり、腫瘍細胞の増殖を阻害する活性やアポトーシスを誘導する活性を持つことが報告されている。さらに、ウシ由来のラクトフェリンは、腫瘍組織によって誘導される血管新生を阻害する活性を持つ。これらの知見から、ラクトフェリンの血管新生抑制効果や抗がん作用を利用したガン治療への応用が期待される。

ラクトフェリンは細胞表面の受容体に結合することで、その機能を発揮する。これまでにラクトフェリン受容体として、LDL 受容体関連タンパク質1 (LRP-1)や、インテレクチン1 (オメンチン1) 等が報告されてきたが、これらの受容体でラクトフェリンの機能の全てを説明することができず、未知のラクトフェリン受容体の存在が示唆されていた。

CXCR4 は SDF-1 (Stromal derived factor-1/CXCL12) を内源性リガンドとするケモカイン受容体である。ラクトフェリンはヒト免疫不全ウイルス (HIV) の T 細胞に対する感染を防ぐことが知られている。HIV の T 細胞に対する結合・感染は T 細胞表面に発現している CXCR4 と HIV 表面に発現している gp120 との結合に依存していることから、ラクトフェリンが CXCR4 に結合する可能性が示唆されていた。

## 2. 研究の目的

- (1) ウシ由来ラクトフェリンの血管新生阻害作用を持つ部位を明らかにする。
- (2) 血管内皮細胞におけるラクトフェリン受容体を同定する。本研究では、その候補として CXCR4 のラクトフェリン受容体としての機能を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) ラクトフェリン断片の血管新生阻害効果の検討

### ①. ラクトフェリン断片の調整

ウシ由来ラクトフェリンは pH8.2 の条件下で、トリプシンにより部分分解した。この結果得られた、N ローブ断片 (LFN) と C ローブ断片 (LFC)、および未分解ラクトフェリンは、陰イオン交換カラム (DEAE) を装着した高速液体クロマトグラフィーを用いて、分離・精製した。

### ②. 断片の血管新生阻害能の評価

ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を VEGF の存在下でコラーゲンゲルを用いたサンドイッチ培

養することで、血管新生を誘導した。培養系に、VEGF-A (10 ng/ml) およびラクトフェリン断片を添加後、隔日に培養液を交換し、11 日間培養を継続することで、血管新生に対する影響を評価した。コラーゲンゲルは固定後、抗 CD31 抗体で免疫染色した。管腔形成の程度は、サンドイッチ培養したゲルの写真を上方から撮影し、視野内の管腔の総延長、管腔の分岐点の数、分岐点から派生している管腔の数をカウントすることにより行った。統計処理は、Welch の t 検定を用いた。

### (2) CXCR4 とラクトフェリンの結合性の検討

7 回膜貫通タンパク質である CXCR4 の立体構造を保持した状態で、ラクトフェリンとの相互作用を評価するため、CXCR4 を過剰発現させた CHO 細胞由来のリポ粒子をビオチン化したものを結合実験に用いた。ネガティブ・コントロールとして CXCR4 を含有していないビオチン化リポ粒子を用いた。ウシラクトフェリンは、サンドイッチ ELISA 法の原理で、抗ラクトフェリン抗体を介してポリスチレンウェルに固相化した。1%BSA を含む T-TBS でブロッキングした後、各リポ粒子を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。T-TBS で洗浄後、HRP-アビジンとインキュベートし、さらに洗浄後、NBT/BCIP 試薬を用いて発色反応を行った。450nm の吸光を測定することで、リポ粒子とラクトフェリンの相互作用を評価した。統計処理は、Welch の t 検定を用いた。

### (3) ラクトフェリンによる CXCR4 修飾の検討

#### ① CXCR4 の二量体形成の検討

CXCR4 発現細胞を、ラクトフェリン (最終濃度 10  $\mu$ M) およびポジティブ・コントロールとして SDF-1 で刺激した。刺激後、培養皿を直ちに氷上に移し 30 分間静置した。水溶性の架橋剤である BS3 を培養液に添加し、さらに 15 分間静置した。氷冷 PBS で 2 回洗浄後、RIPA バッファーにより細胞内のタンパク質を可溶化した。CXCR4 抗体により免疫沈降後、抗 CXCR4 抗体によりウェスタンブロットティングすることにより、CXCR4 の二量体形成を検出した。

#### ② CXCR4 のチロシンリン酸化の検討

無血清状態で培養した CXCR4 発現細胞をラクトフェリン (最終濃度 10  $\mu$ M) で 5 分間刺激し、細胞内のタンパク質を RIPA バッファーで可溶化した。抗 CXCR4 抗体による免疫沈降後、免疫沈降物を抗リン酸化チロシン抗体 (PY-20) によるウェスタンブロットティングを行うことで CXCR4 のチロシンリン酸化の程度を評価した。なお、ポジティブ・コントロールとして細胞を SDF-1 で同様に刺激し、CXCR4 のチロシンリン酸化の程度を比較した。

#### ③ CXCR4 のユビキチン化の検討

CXCR4 発現細胞を、プロテオソームの阻害剤である MG132 で 6 時間処理後、ラクトフェリンまたはポジティブ・コントロールとし

て SDF-1 で刺激し、直ちに氷上に培養皿を移し 30 分間静置した。氷冷 PBS で 2 回洗浄後、RIPA バッファーにより細胞内のタンパク質を可溶化した。CXCR4 抗体により免疫沈降後、免疫沈降物を、抗ユビキチン抗体 (P4D1) によりウェスタンブロッティングすることにより、CXCR4 のユビキチン化を検出した。

#### (4) CXCR4 の代謝回転の評価

CXCR4 発現細胞をシクロヘキシミドで 15 分間処理し、タンパク質の新規合成を阻害した状態で、ラクトフェリン (最終濃度 10  $\mu$ M) で刺激し、3 時間および 6 時間後の CXCR4 発現量をウェスタンブロッティングで解析した。ポジティブ・コントロールには SDF-1 を用いた。

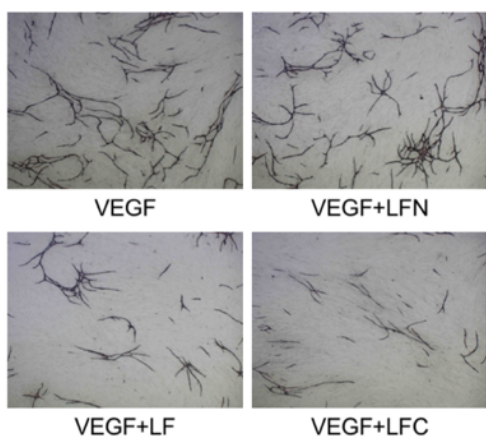
### 4. 研究成果

#### (1) ラクトフェリン断片の血管新生阻害効果の検討

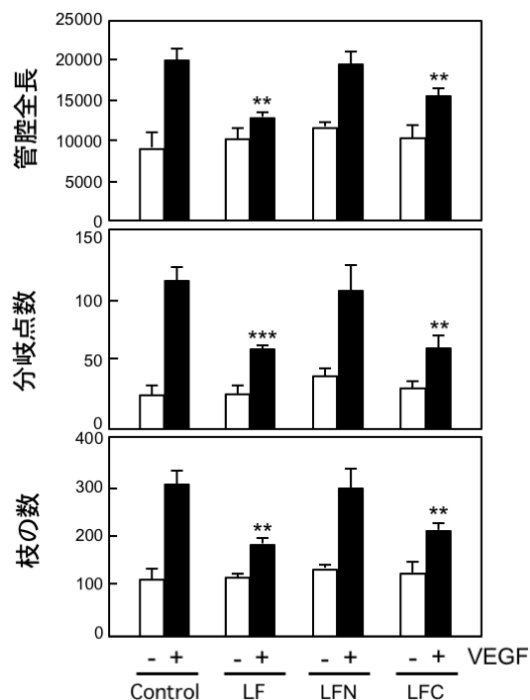
VEGF による血管新生は、ウシ由来ラクトフェリン (最終濃度 1  $\mu$ M) により阻害された。同濃度の C ロープ断片 (LFC) は、ラクトフェリンの全長とほぼ同程度の血管新生阻害効果を示した。一方、N ロープ断片 (LFN) の血管新生阻害効果は認められなかった (図 1)。管腔形成の程度は、管腔の総延長・管腔の分岐数・分岐点あたりの枝の数により定量化したが、いずれのパラメータを用いた場合でも結果は同一であった (図 2)。なお、VEGF 非存在下では、ラクトフェリン全長および各断片 (LFC・LFN) には、単独で血管新生を阻害あるいは誘導する活性は認められなかった (図 2)。これらの結果により、ウシラクトフェリンの血管新生阻害活性は主に C ロープが担っていることが明らかになった。

#### (2). CXCR4 とラクトフェリンの結合性の検討

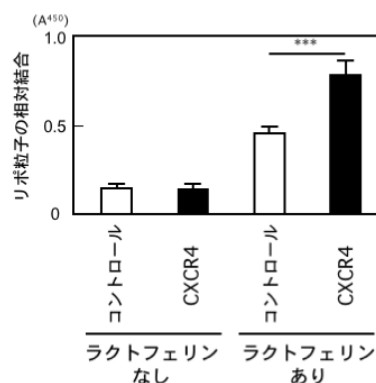
ネガティブ・コントロール (CXCR4 を含有していないコントロールリポ粒子) と比較



して、CXCR4 含有リポ粒子とラクトフェリン  
**図 1** VEGF によって誘導された血管新生に対するウシラクトフェリン (LF) ・ N ロープ断片 (LFN) ・ C ロープ断片 (LFC) の阻害効果 管腔は抗 CD31 抗体で免疫染色した



**図 2** VEGF によって誘導された血管新生に対するウシラクトフェリン (LF) ・ N ロープ断片 (LFN) ・ C ロープ断片 (LFC) の効果 \*\*\*:0.1%の水準で有意差あり \*\*:1%の水準で有意差あり



**図 3** CXCR4 含有リポ粒子の固相化ラクトフェリンへの結合 \*\*\*:0.1%の水準で有意差あり

の結合は有意に大であり、約 1.7 倍の結合値を示した。一方、CXCR4 含有リポ粒子は、ラクトフェリンを固相化していないポリスチレンプレートには殆ど接着せず、ラクトフェリンと CXCR4 の細胞外ドメインとの相互作用が示唆された (図 3)。

#### (3). ラクトフェリンによる CXCR4 修飾の検討

ラクトフェリンで刺激された細胞では、SDF-1 刺激を受けた細胞と同様、CXCR4 (40K) の倍の分子量 (80K) のバンドが検出され、ラクトフェリン刺激により CXCR4 の二量体形成が促進されたことが示唆された。

一方、ラクトフェリン刺激により、5-30 分後に、CXCR4 のチロシン酸化とユビキチン化が認められた。これらの程度も SDF-

1 刺激の場合とほぼ同等であった。これらの結果により、CXCR4 は、ラクトフェリン刺激により、SDF-1 刺激の場合と同様の修飾を受けることが明らかになった。

#### (4). CXCR4 の代謝回転の評価

ラクトフェリン (最終濃度 10  $\mu$ M) 刺激により、細胞表面の CXCR4 発現量は、SDF-1 で刺激した場合とほぼ同程度減少し、ラクトフェリンにより CXCR4 がエンドサイトーシスを受けて、代謝回転が促進された可能性が示唆された (図 4)。

これらの結果により、CXCR4 がラクトフェリン受容体として機能している可能性が示された。今後は、CXCR4 とラクトフェリンの結合定数の測定など、受容体としての機能について、より詳細な解析を進めていく予定である。

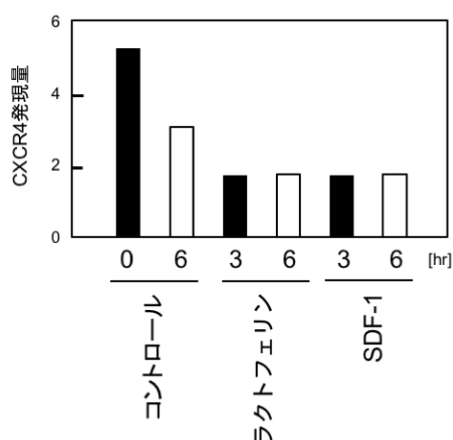


図 4 ラクトフェリンおよび SDF-1 刺激の CXCR4 発現に対する影響

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 高山喜晴、乳に多く含まれるタンパク質ラクトフェリンの多面的な機能 酪農ジャーナル、2015 年 7 月号、15-17 頁、査読なし、
- ② 高山喜晴、ラクトフェリン 畜産技術、728 号、44 頁、査読なし、

[学会発表] (計 8 件)

- ① 内田良、青木玲二、青木綾子、田島淳史、高山喜晴 Promoting effect of bovine lactoferrin on epithelial differentiation and barrier function of HaCaT human keratinocytes. The XII-th International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and Applications, 2015 年 11 月 6 日、ウェスチンナゴヤキャッスル (愛知県名古屋市)

- ② 高山喜晴、青木玲二、青木綾子 CXC chemokine receptor 4 behaves as a lactoferrin receptor. The XII-th International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and Applications, 2015 年 11 月 5 日、ウェスチンナゴヤキャッスル (愛知県名古屋市)
- ③ 高山喜晴、青木玲二、青木綾子 Activation of CXC chemokine receptor by lactoferrin. The 40<sup>th</sup> FEBS Congress, 2015 年 7 月 9 日、ベルリン (ドイツ)
- ④ 内田良、青木玲二、青木綾子、田島淳史、高山喜晴、ケラチノサイトのバリア機能に対するウシラクトフェリンの促進効果、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学 (岡山県岡山市)
- ⑤ 高橋ひとみ、高山喜晴、平子誠、ウシ子宮内膜上皮細胞でのリポポリサッカライドあるいはラクトフェリン存在下における炎症性サイトカイン遺伝子発現の検討、日本ラクトフェリン学会第 6 回学術集会、2014 年 11 月 8 日 エポカルつくば (茨城県つくば市)
- ⑥ 青木玲二、高山喜晴、ウシラクトフェリンの T 細胞における PI3K 依存的な細胞凝集の促進と PI3K 非依存的な細胞凝集の促進、日本ラクトフェリン学会第 6 回学術集会、2014 年 11 月 8 日 エポカルつくば (茨城県つくば市)
- ⑦ 高山喜晴、青木玲二 Role of CXCR4 on lactoferrin-induced activation of PI-3K signaling pathway. The XI-th International Conference of Lactoferrin, Structure, Function and Application, 2013 年 11 月 6 日、ローマ (イタリア)
- ⑧ 高山喜晴、骨をまもるタンパク質ラクトフェリン、ifiaJAPAN201 日本ラクトフェリン学会セミナー、2013 年 5 月 15 日、東京ビックサイト (東京都江東区)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高山 喜晴 (TAKAYAMA, Yoshiharu)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門・畜産物研究領域・上級研究員

研究者番号：00343989