

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	羽廣 敦也
学位論文題目			
Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells 〔ヒト膵癌由来細胞のゲムシタピン誘導アポトーシスにおける p38 MAPK 活性化に関する研究〕			
共著者名：丹野誠志、小泉一也、伊澤 功、中野靖弘 小山内学、水上裕輔、奥村利勝、高後 裕			
未公表			
研究目的			
<p>膵癌は欧米と同様に、本邦においても増加傾向にあるが、大部分がリンパ節や肝、腹膜などへの転移を有する進行癌であるため、外科切除不能なことが多い。このため、進行膵癌の予後は 3~6 カ月ときわめて不良であり、外科切除例を含めても 5 年生存率は 10%に満たない。これまで、進行膵癌の治療には、5-フルオロウラシル (5-FU) を用いた全身化学療法が施行されてきたが、膵癌の予後向上にはほとんど効果を認めなかった。代謝拮抗剤であるゲムシタピンは、膵癌での有効性が確立された初めての抗癌剤であり、5-FU に比べて高い奏効率と優れた症状緩和効果を示すことが、近年の大規模多施設試験によって支持された。しかし、ゲムシタピンを用いてもなお進行膵癌の 1 年生存率は 18%と不良であり、治療効果を増強する併用薬剤の重要性が高まってきている。ゲムシタピンは細胞内で活性化されたのち、リボヌクレオチド還元酵素阻害や DNA 修復阻害、DNA 伸長反応停止など、複数の作用機序が考えられているが、ゲムシタピンのアポトーシスを誘導する細胞内分子や応答機構は未だ不明であり、機序の解明が膵癌治療に及ぼす臨床的意義は大きいものと考えられる。</p> <p>多くの抗癌剤において、アポトーシスを誘導するシグナル経路が感受性を決定する因子として重要とされているが、一方でアポトーシスを抑制するシグナル経路の重要性も近年明らかにされつつある。このような細胞の生と死を制御するシグナル伝達分子として、細胞内リン酸化蛋白である p38 や JNK (c-Jun N-terminal protein kinase)、ERK (extracellular signal-regulated kinase)、Akt の関与が重要視されているが、膵癌細胞のゲムシタピン誘導アポトーシスにおけるこれら蛋白質の役割を検討した報告はない。本研究の目的は、ヒト膵癌由来細胞株 PK-1 および PCI-43 を用いて、これら 4 種類のシグナル伝達経路へのゲムシタピン暴露による影響について検討し、ゲムシタピン誘導アポトーシスに深く関与する経路を明らかにすることである。</p>			
材料・方法			
1. 膵管癌細胞株 ヒト膵管癌由来細胞株 PK-1 を東北大学加齢医学研究所より、PCI-43 を北海道大学大学院医学研究科分子病理より供与をうけ研究に使用した。			
2. WST-1 assay 96 穴 dish に各細胞 3,000/well を 24 時間培養した後、塩酸ゲムシタピン (Eli Lilly) を添加した培養液と交換した。48 時間後、Cell Counting Kit (和光) にて、インキュベーター内で 1 時間呈色反応を行った後、プレートリーダーにて吸光度 (450nm) を測定した。			
3. アポトーシスの検出			

ゲムシタピンによる細胞周期の変化及びアポトーシスの検出を flow cytometry を用いて検討した。PK-1 および PCI-43 の両細胞株を、ゲムシタピン $10\mu\text{M}$ 単独で 48 時間処理したもの、及び SB203580 (SIGMA) $10\mu\text{M}$ で 24 時間処理後、ゲムシタピン $10\mu\text{M}$ で 48 時間処理したものをトリプシンで回収した後、10% DMSO 含有 RPMI 培養液にて保存した。Flow cytometry で sub-G1 細胞の割合を解析し、アポトーシスを測定した。

4. Western blot 法

細胞を洗浄後、lysis buffer で溶解し細胞を回収した。遠心後、上清の蛋白濃度を測定し、サンプルバッファーと混和し、5 分間煮沸を行った。10% ポリアクリルアミドを用いた SDS-PAGE で電気泳動後、Hybond-C Extra メンブレン (Amersham) に転写した。ブロッッキング操作を行った後、1 次抗体にはウサギ抗 p38、phospho-p38、AKT、phospho-AKT、p42/44、phospho p42/44、JNK/SAPK、phospho JNK/SAPK、PARP 抗体 (New England Biolabs) を 1,000 倍希釈にして使用した。2 次抗体は抗 HRP-linked Rabbit-IgG (H&L) 抗体 (New England Biolabs) を 3,000 倍希釈で反応させた後、ECL detection kit (Amersham) でシグナルの検出を行った。

成 績

1. ゲムシタピンによる膀胱癌細胞のアポトーシスの誘導

ゲムシタピンによって PK-1 および PCI-43 のアポトーシスが誘導される至適濃度を確認するため、WST-1 assay を行った。ゲムシタピン濃度依存性にアポトーシスは起こり、その IC50 は PK-1 で $2.0\mu\text{M}$ 、PCI-43 で $0.5\mu\text{M}$ であった。ゲムシタピン $10\mu\text{M}$ で 48 時間処理した細胞の flow cytometry による解析では、両細胞株において、sub-G1 期細胞の増加と G2-M 期細胞の割合の低下を認めた。

2. ゲムシタピン暴露による phospho p-38 MAPK 蛋白の発現

ゲムシタピン暴露 48 時間後に細胞を回収し、Western blot 法により検討した。両細胞とも Akt、ERK1/2、JNK ではそのリン酸化のレベルに差を認めなかったが、phospho-p38 MAPK では発現の増強を認めた。また、4 種類のリン酸化の総タンパク量には差を認めなかった。

3. ゲムシタピン暴露による MKK3/6 の活性化

p38 MAPK の上流に位置する MKK3/6 の活性化につき検討した。ゲムシタピン暴露 48 時間後の細胞を回収し、Western blot 法により検討したところ、p38 MAPK と同様に phospho-MKK3/6 の発現の増強を認めた。

4. SB203580 処理後の膀胱癌細胞のゲムシタピン感受性

p38 MAPK の特異的な阻害薬である SB203580 で 24 時間処理後にゲムシタピンを添加、さらに 48 時間後に回収し、flow cytometry にて解析した。その結果、SB203580 存在下ではゲムシタピンによるアポトーシスの有意な減少を認めた。

5. SB203580 処理後のゲムシタピンによる poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 切断の抑制

PARP は、活性化された caspase によってアポトーシス早期に切断されることから、caspase 経路活性化のマーカーとなる。PARP と、切断された cleaved 型 PARP を認識するそれぞれの抗体を用いて、Western blot 法にて検討した。PK-1 細胞において、ゲムシタピン $10\mu\text{M}$ で 48 時間処理したものでは、コントロールと比べ cleaved 型 PARP の発現の増強を認め、PARP の発現の低下を認めた。それに対して、SB203580 $10\mu\text{M}$ で 24 時間処理後にゲムシタピンを添加して 48 時間処理したものでは、cleaved 型 PARP の発現が強く抑制された。

考 按

本研究では、1) ゲムシタピン暴露によって膀胱癌細胞にアポトーシスが誘導されること、同じ濃度のゲムシタピンによって、検討した 4 種類のシグナル伝達経路のうち、2) p38 MAPK の活性化が強く惹起されること、を示した。さらに、3) ゲムシタピン暴露による p38 MAPK 活性の亢進を、p38 MAPK の activator である上流の MKK3/6 が同様に活性化されることによって証明した。また、4) p38 MAPK の選択的阻害剤である SB203580 処理は、ゲムシタピン誘導アポトーシスを著明に抑制すること、5)

ゲムシタピン暴露によって PARP が切断されるが、SB203580 処理によって著明に抑制されることを示した。本研究結果は、ゲムシタピンが p38 MAPK 活性化を介して膵癌細胞にアポトーシスを誘導しており、アポトーシス誘導に p38 MAPK 活性が必要であることを示していると考えられる。興味深いことに、p38 MAPK 活性化は、白血球や心筋細胞、繊維芽細胞などの正常細胞ではアポトーシスを誘導せず、腫瘍細胞や形質転換細胞においてアポトーシス誘導のトリガーとなることが報告されている。このことは、p38 MAPK の activator が、より癌細胞選択的にゲムシタピン効果増強を引き起こしうることを示している。

Caspase 経路の活性化は、ミトコンドリアの障害に伴って放出される cytochrome *c* が Apaf-1 や procaspase-9 と結合することによって誘導される。近年、ゲムシタピンによって誘導されるアポトーシスにおいても、caspase-3、-8、-9 を含む caspase 経路活性化が重要であることが報告されたが、p38 MAPK との関連は不明であった。本研究結果は、ゲムシタピンによって誘導される caspase 経路の活性化に p38 MAPK が関与することを示しており、p38 MAPK-caspase の経路がゲムシタピン誘導アポトーシスに重要であると考えられた。

結 論

ヒト膵癌由来細胞において、p38 MAPK 活性化がゲムシタピンによって誘導されるアポトーシスに重要な役割を担うことを示した。今後、p38 MAPK 活性化を標的とする薬剤との併用により、膵癌のゲムシタピン治療効果を増強し、再発膵癌や感受性低下、耐性化の治療に貢献すると考えられた。

引用文献

- 1) Korc, M. Role of growth factors in pancreatic cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 7: 25-41, 1998
- 2) Burris, H.A., Moore, M.J., Anderson, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Mondiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F.A., Stephens, C.D., and Von Hoff, D.D. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomised trial. *J. Clin. Oncol.*, 15: 2403-2413, 1997
- 3) Alvarado-Kristensson, M., Porn-Ares, M.I., Grethe, S., Smith, D., Zheng, L., and Anderson, T. p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis. *FASEB J.*, 16: 129-131, 2002

参考論文

- 1) Mizukami Y, Ura H, Obara T, Habiro A, Izawa T, Osanai M, Yanagawa N, Tanno S, Kohgo Y (2001): Requirement of c-jun N-terminal kinase for apoptotic cell death induced by farnesyltransferase inhibitor, farnesylamine, in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 198-204, 2001

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏名	羽広 敦也
<p style="text-align: center;">審査委員長 若 官 伸 隆 ㊞</p> <p style="text-align: center;">審査委員 小 川 勝 洋 ㊞</p> <p style="text-align: center;">審査委員 高 後 裕 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells (ヒト膵癌由来細胞のゲムシタピン誘導アポトーシスにおける) p38 MAPK 活性化に関する研究</p>			
<p>膵癌の大部分は進行癌で発見されるため、その予後は極めて不良であり、抗癌剤低感受性癌のために有効な抗癌剤は殆ど報告されていない。新規抗癌剤ゲムシタピンは、5-FU など他の抗癌剤と比較すると、近年有意に優れた奏功率を示すことが無作為比較試験によって明らかになり、現在膵癌治療の第1選択薬とされている。一方、多くの抗癌剤においてはアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路が感受性を決定する因子としてその重要性が指摘されている。シグナル伝達分子としては細胞内リン酸化蛋白である p38 や JNK、または Akt, ERK などがあげられ、いくつかの抗癌剤でその関与が明らかになっている。当該研究の目的は、膵癌細胞株を用いてゲムシタピン暴露における影響を検討し、さらにその際誘導される細胞死に関わるシグナル伝達経路の道筋を明らかにすることである。</p>			

研究方法としては、ヒト膵癌由来細胞株 PK-1 及び PCI-43 を用いて、ゲムシタピン暴露におけるアポトーシス誘導を flow cytometry や WST-1 アッセイにより検討した。次にゲムシタピン暴露による Akt、ERK、JNK、p38 の活性化の有無を検討し、つぎに p38 の活性化メカニズムに関わる因子の検討をウエスタンブロット法にて解析し、以下の結果を得た。

- 1) ゲムシタピン暴露によって膵癌細胞にアポトーシスが誘導された。
- 2) 同じ濃度のゲムシタピンによって、検討した4種類のシグナル伝達経路のうち、p38 MAPK の活性化が強く惹起されることが認められた。
- 3) ゲムシタピン暴露による p38 MAPK 活性の亢進を、p38 MAPK の activator である上流の MKK3/6 が同様に活性化されることによって証明された。
- 4) p38 MAPK の選択的阻害剤である SB203580 処理は、ゲムシタピン誘導アポトーシスを著明に抑制した。
- 5) ゲムシタピン暴露によって Caspase 経路の活性化を示す PARP の切断が認められたが、SB203580 処理によってその切断が著明に抑制された。

これらの研究結果から ゲムシタピンが膵癌細胞に実際にアポトーシスを誘導すること アポトーシス誘導には p38 MAPK 活性が必要であること ゲムシタピンによって誘導される caspase 経路の活性化に p38 MAPK が関与することを明らかにしました。

本結果は、p38 MAPK-caspase の経路がゲムシタピン誘導アポトーシスに関与することを明らかにした初めての報告である。

これらの知見は、膵癌治療において、p38 を活性化する他の薬剤との併用が膵癌のゲムシタピン治療効果を増強し、ひいては再発膵癌や感受性の低い薬剤抵抗性である癌の治療に貢献しうる可能性を強く示唆するものである。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に対する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。