

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	水上 裕輔
学位論文題目			
オレイルアミン（長鎖脂肪アミン）による MAPK を介した膵癌細胞における細胞死誘導			
北海道医学雑誌 第 76 巻第 6 号 平成 13 年 11 月 掲載			
研究目的			
<p>膵癌の 90% に癌遺伝子である K-ras の point mutation が認められる。K-ras 産物 p21^{ras} を含む低分子量 G 蛋白質は C 末端のプレニル化（farnesyl 化または geranylgeranyl 化）により細胞膜に局在しその機能を発現する。Farnesyltransferase inhibitor (FTI) はこの過程を阻害することで p21^{ras} の機能を抑制するため ‘anti-ras drug’ として注目され、腫瘍細胞に選択的な増殖抑制効果を有する¹⁾。現在米国で FTI の臨床試験が行われているが、個々の FTI の作用メカニズムに関しては未だ不明な点が多く、最近では FTI の標的分子として p21^{ras} 以外のシグナル伝達物質が重要である可能性も示されている。</p> <p>従来より isoprenoid には腫瘍の増殖抑制や抗癌剤の増強効果などの作用があり、さらにアミノ基結合型の isoprenoid はアミノ基非結合型の誘導體に比較し強力な抗腫瘍効果を有することが報告されている²⁾。我々は farnesyl isoprenoid の誘導體である Farnesylamine が K-ras 形質転換細胞やヒト膵癌細胞において p21^{ras} の farnesyl 化を抑制するとともにアポトーシスを誘導することを過去に報告した³⁾。しかし FTI は通常 K-ras に対する farnesyl 化阻害効果は H-ras に比較して極めて乏しく、<i>in vitro</i> で効果の多くは ‘cytostasis’ で、‘cytotoxic’ な効果は例外的である。このような一般的に知られている FTI の特性から Farnesylamine によるアポトーシス誘導機構を説明するのは困難で、特有の作用メカニズムの存在が推測される。</p> <p>今回 Farnesylamine の細胞死誘導効果がアミノ基結合型の長鎖脂肪構造に由来する可能性を考え、長鎖脂肪アミンであるオレイルアミンを用い膵癌細胞に対する抗腫瘍効果および細胞死関連シグナルについて検討した。</p>			
材料・方法			
<p>1. 細胞培養：ヒト膵癌細胞株として PK-1, PK-8, PK-9, MIA PaCa-2, BxPC-3 を用いた。NIH3T3 を用い K-ras transformant (<i>ras</i> 細胞) をリポフェクション法で作成した。同様に dominant-negative JNK1 (pLNCX-HA-JNK1-APF; Dr. Lynn E. Heasley より供与) を PK-1 に導入した。これらの細胞株は 10% FBS 加 RPMI1640 または DMEM の存在下で培養した。</p>			

2. 薬剤：脂肪アミンとして C6~18 の alkyl chain から成る物質を用いた。また Oleylamine (C18:1、以下 OA)の誘導体である Oleyl alcohol, Oleic acid も用いた。Farnesylamine (以下 FA) は既報の通りに東レ株式会社医薬事業部に依頼して合成した。Caspase 阻害剤として Z-VAD-fmk と Z-DEVD-fmk、MEK1/2 阻害剤として PD-098059、autophagy 阻害剤として 3-methyladenine を用いた。

3. 殺細胞効果：細胞を 96-well plate に 2×10^3 cells/well で播種後、各薬剤を 0-100 μ M の濃度で添加し、24 時間後に WST-1 assay を施行した。

4. アポトーシスの検出：DNA を phenol/chloroform 法で抽出し、2%アガロースゲルにて DNA の断片化を検出した。

5. 細胞免疫染色：OA 存在下で 12 時間培養した細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、抗 lysosome-associated membrane proteins-1 (LAMP-1) 抗体および FITC 標識抗 LAMP-1 抗体で免疫染色し蛍光顕微鏡を用い観察した。

6. Western blotting：ras 細胞を用い p21^{ras} の farnesyl 化の有無を電気泳動度の差を利用して検出した (抗 pan-ras 抗体)。MAPK phosphatase-1 (MKP-1)の発現を抗 MKP-1 抗体を用い検出した。

7. *in vitro* Kinase Assay：MAPK (JNK, p38, ERK)と Akt の活性変化を経時的に測定した。薬剤添加後の cell lysate を immuno-precipitate した後に各々の基質と ATP の存在下で反応させ、基質に対するリン酸化抗体を用い kinase 活性を検出した。

成績

1. 各種脂肪アミンの中で鎖長が C12 以上の長鎖脂肪アミンはヒト膀胱癌細胞株に対し殺細胞効果を示した。OA の細胞毒性は他の長鎖脂肪アミンより強力で、その IC50 値は 14~27 μ M と FA と同程度であった。一方 Hexylamine (C6)や Octylamine (C8)などの短鎖脂肪アミンや、アミノ基を持たない OA の誘導体では高濃度においても殺細胞効果を示さず、長鎖脂肪とアミノ基の双方が細胞死誘導において重要であった。OA は ras 細胞に対しても濃度依存性に殺細胞効果を示したが、NIH3T3 に対する効果は乏しかった。また変異型 K-ras を有する PK-1, PK-9 における OA の IC50 値は野生型 K-ras を有する BxPC-3 に比較し有意に低く、K-ras 活性が OA に対する感受性を規定すると考えられた。

2. 膀胱癌細胞株および ras 細胞において OA 添加の約 9-12 時間後より濃度依存性に DNA の断片化がみられ、アポトーシス誘導が確認された。Caspase 阻害剤は膀胱癌細胞株において OA 添加 12 時間後の細胞死を濃度依存性に抑制したが、24 時間後における抑制効果は低かった。しかし Caspase 阻害剤の存在下でみられる細胞死においては DNA の断片化は認められず、OA は比較的早期にみられるアポトーシスとは別に caspase 非依存性の経路を介して細胞死をもたらすと考えられた。細胞死の過程で細胞質内に空胞形成を認めたが、これらは免疫染色で LAMP-1 陽性であり lysosome 由来の autophagic vacuoles と考えられた。空胞は Caspase 阻害剤の存在下でも観察されたが、autophagy の阻害剤 3-methyladenine の存在下では認められず、caspase 非依

存性の細胞死は Type-2 cell death であると考えられた。

3. *ras* 細胞において OA 30 μ M 添加 24 時間後の p21^{ras} の farnesyl 化阻害はみられなかった。OA は PK-1 に JNK の活性化を誘導し、その活性は添加 1 時間後をピークに数時間持続した。また PK-1 において JNK と同様の時間経過で p38 の活性化もみられたが、これらストレス応答性の MAPK の活性化はアミノ基非結合型の OA 誘導體や短鎖脂肪アミンではみられず、また *ras* 細胞でみられたのに対し NIH3T3 では認められず、殺細胞効果に関連すると考えられた。p21^{ras} の下流のシグナルについては OA 添加の 3~6 時間後に ERK 活性が低下したが、Akt 活性に変化は認めなかった。JNK 活性化の後に MKP-1 の発現増強が認められ、ERK の活性低下に先行しておりこれらの MAPK の間に cross talk が存在する可能性が示唆された。dominant negative JNK (JNK1-APF) を導入した PK-1 では OA による細胞死は著明に抑制され、OA 50 μ M 添加後の DNA 断片化は抑制された。一方細胞質内の空胞形成は JNK1-APF の影響を受けなかった。また PD-098059 により ERK 活性を抑制しても膵癌細胞株ではアポトーシスや autophagy は誘導されず、ERK の単独抑制は膵癌細胞において細胞死誘導シグナルとはならなかった。

考 案

今回の実験で OA を含む長鎖脂肪アミンがヒト膵癌細胞や K-ras 形質転換細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした。各種脂肪アミンやその誘導體の殺細胞効果の比較により、長鎖脂肪と遊離アミノ基という双方の構造が細胞死誘導に必須と考えられる。また FA が farnesol などのアミノ基非結合型の farnesyl isoprenoid に比較し膵癌細胞に対して極めて強力な殺細胞効果を示すという実験結果も得ており、さらに各種脂肪アミンが FTI 活性を示さなかったことから、FA の膵癌細胞に対するアポトーシス誘導機構においても長鎖脂肪アミン構造に起因したメカニズムの存在が推定される。これらの結果は従来より効腫瘍効果が明らかにされている他の isoprenoid においても遊離アミノ基の結合により抗腫瘍効果が著しく増強するという過去の報告を説明するものと考えられる。

OA による細胞死はアポトーシスとしての性質を有する反面、autophagic vacuoles と考えられる細胞質内空胞の存在から type-2 cell death としての側面を有することが示された。このことは Caspase 阻害剤が DNA 断片化を完全に抑制するが、細胞死を完全には抑制しないことと合致する。すなわち OA は caspase 非依存性の経路を介して type-2 cell death を誘導した結果、膵癌細胞は Caspase 阻害剤の存在下においても遅延性の細胞死に至ると考えられる。

次にアポトーシス関連シグナルとしての JNK 活性化の重要性である。これは JNK1-APF の導入が OA による膵癌細胞の DNA 断片化を阻害したことにより明らかにされた。最近 JNK が Bcl-2 や他の mitochondria 結合蛋白のリン酸化を介して cytochrom c の細胞質内遊離を促進し、caspase の活性化を誘導することがいくつかの報告により示された。このことは JNK とアポトーシスの関連を否定するデータが蓄

積されるなか、JNK が c-jun のリン酸化による転写活性のみならず、アポトーシス実行経路に直接影響を及ぼすことを実証したものである。OA による JNK の活性化は Caspases 阻害剤の影響を受けず、JNK は Caspases の上流に存在すると考えられる。一方、細胞質内の空胞形成は JNK1-APF の影響を受けなかった。ERK の活性低下の機序やアポトーシス誘導シグナルとしての意義は今回の実験結果からは明らかではないが、JNK の活性化と同時にみられる ERK の抑制が JNK-アポトーシス経路に補助的に作用する例も示されている。またアポトーシス抑制経路としての ERK の役割も知られており、OA による ERK 抑制がアポトーシス誘導を促進する因子となった可能性がある。一方 JNK の活性化の後に MKP-1 の発現が増強していることから、JNK と ERK の間に negative feedback 機構を介する cross talk が存在する可能性も示唆された。またヒト膵癌において Akt は m-RNA レベルでの発現亢進がみられ、さらにアポトーシス抵抗性や転移浸潤能などの悪性度に関連するとされるが、OA による Akt 活性の変化は認められず、アポトーシスにおける PI3-kinase/Akt 経路の関与は否定された。

結 論

長鎖脂肪アミン構造はヒト膵癌細胞や K-ras 形質転換細胞に対し JNK を含む MAPK family を介して細胞死を誘導し、この機構が Farnesylamine の K-ras 形質転換細胞におけるアポトーシス誘導効果を説明するものと考えられた。

引用文献

1. Kohl NE, Mosser SD, deSolms S, Giuliani EA, Pompliano DL, Graham SL, Smith RL, Scolnick EM, Oliff A, and Gibbs JB. Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyltransferase inhibitor. *Science* 260: 1934-1942, 1993.
2. Ikezaki K., Yamaguchi T., Miyazaki C., Ueda H., Kishiye T., Tahara Y., Koyama H., Takahashi T., Fukawa H., Komiyama S., Kuwano M Potentiation of anticancer agents by new synthetic isoprenoids. I. Inhibition of the growth of cultured mammalian cells. *J Natl Cancer Inst* 73: 895-901, 1984
3. Ura H, Obara T, Ryushi S, Akinori I, Tanno S, Tsuneshi F, Nishino N, and Kohgo Y. Selective cytotoxicity of farnesylamine to pancreatic carcinoma cells and Ki-ras-transformed fibroblast. *Mol. Carcinog.* 21: 93-99, 1998.

参考論文

- 1 Obara T, Tanno S, Fujii T, Izawa T, Mizukami Y, Yanagawa N, Ura H, Kohgo Y. Epithelial cell proliferation and gene mutation in the mucosa of gallbladder with pancreaticobiliary malunion and cancer. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* 6: 229-236, 1999.
- 2 Tanno S, Obara T, Fujii T, Mizukami Y, Shudo R, Nishino N, Ura H, Klein-Szanto AJ, Kohgo Y. Proliferative potential and K-ras mutation in epithelial hyperplasia of the gallbladder in patients with anomalous pancreaticobiliary ductal union. *Cancer* 83: 267-275, 1998.
- 3 水上裕輔、藤井常志、小原 剛、中野靖弘、有里智志、齋藤博哉、高後 裕。胆道系疾患の胆管腔内超音波検査法—胆管癌の進展度診断— *臨床科学* 35; 359- 368, 1999.
4. Mizukami Y, Saito H, Obara T, Arisato S, Nakano Y, Sakurai Y, Izawa T, Kohgo Y. Temporary use of an accuflex stent for unextractable common bile duct stones. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15: 680-683, 2000.

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	水上 裕輔
審査委員長 高 後 裕 ㊟ 審査委員 飯 塚 一 ㊟ 審査委員 小 川 勝 洋 ㊟			
学 位 論 文 題 目 オレイルアミン (長鎖脂肪アミン) による MAPK を介した膵癌細胞における細胞死誘導			
膵癌は最も悪性度が高い消化器癌の1つで、従来の化学療法剤では有効性に乏しく、新たな治療法の開発が望まれる。膵癌の90%に癌遺伝子である K-ras 変異が認められ、K-ras 産物である p21 ^{ras} は膵癌治療の分子標的として有望である。教室の浦らは p21 ^{ras} の機能を抑制する farnesyl transferase inhibitor (FTI) の1つである farnesylamine は、膵癌にアポトーシスを誘導することを示した。しかし、FTI は一般的に k-ras に対する抑制効果は H-ras に比較して乏しく、また FTI の抗腫瘍効果は増殖抑制でアポトーシス誘導に関する報告は少ない。筆者は、farnesylamine の長鎖脂肪アミン構造に注目し、FTI 活性のない長鎖脂肪アミンとしてのオレイルアミンによる膵癌細胞に対する抗腫瘍効果の有無、誘導される細胞死の特徴、さらに関連シグナル伝達機構を解析した。 ヒト膵癌細胞株 PK-1、PK-8、Pk-9、MIAPaCa2、BxPC3 と非形質転換細胞とし			

てマウス線維芽細胞 NIH3T3, その ras 形質転換細胞および PK-1 に dominant negative JNK1 を導入した細胞を用いた。P21ras の farnesyl 化は SDS 電気泳動の移動度の差で検出した。殺細胞効果は WST-1 assay で測定した。アポトーシスは DNA 断片化でみた。抗 LAMP 抗体を用いた免疫蛍光染色で、細胞の空胞化を伴う細胞死を観察した。MAPkinase および AKT 活性 は in vitro kinase assay でみた。

その結果、(1) C12 以上の長鎖脂肪構造を有するアミンは、人膀胱癌細胞株 PK-1 および k-ras 形質転換 NIH3T3 細胞に対し著しい殺細胞効果を示し、とくにオレイラミン (C18:1 amine) が最も強く、farnesylamine と同程度であった。

(2) オレイラミンによる細胞死はアポトーシスと同時に caspase 非依存性の autophagy (type-2 cell death) を誘導した。(3) オレイラミンはストレス刺激性 MAPkinase (JNK) を誘導した。(4) dominant negative JNK を導入した PK-1 では JNK の活性化は著明に抑制された。(5) ERK の活性阻害と JNK の活性化にはクロストークがみられたが、Akt は関与しなかった。

以上の成果は、長鎖脂肪アミンであるオレイラミンがヒト膀胱癌細胞に対し細胞死を誘導し、この細胞死はアポトーシスとしての特徴と同時に caspase 非依存性の側面 (autophagy) も有することを示した。またオレイラミンの作用機構として JNK の活性化が必須であることを明らかにした。JNK の活性化によるアポトーシス誘導は FTI において報告がなく、すでに報告した farnesylamine も長鎖脂肪アミンと同様のシグナル伝達機構を介して細胞死を誘導していると考えられた。本研究の成果は、有効な治療法のない膀胱癌に対する新規薬剤を開発する上で、重要な知見である。論文審査後、論文提出者に対し諮問審査を行い、本論文の内容および関連領域に関して十分な回答が得られた。よって、本論文は、博士 (医学) 論文として価値あるものと判定した。