

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	小泉一也
学位論文題目			
Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase is Necessary for Gemcitabine-Induced Cytotoxicity in Human Pancreatic Cancer cells			
(ヒト膵癌細胞株におけるゲムシタピン誘導細胞毒性にはp38 MAPKの活性化が必要である)			
共著者名			
丹野誠志, 中野靖弘, 羽廣敦也, 伊澤 功, 水上裕輔, 奥村利勝, 高後 裕			
未公表			
研究目的			
<p>膵癌は増加傾向にあるが、早期発見の困難さから大部分は切除不能の進行癌である。切除不能例での予後は極めて不良であり、膵癌の予後を改善させるためには全身的治療法である化学療法の発展が切望されている。ヌクレオシド系代謝拮抗剤であるゲムシタピンは膵癌化学療法に従来用いられてきた5-FUとの第3相比較試験において、生存期間、症状緩和効果が有意に優ることが示され、膵癌化学療法の標準的治療薬として現在広く世界で使用されるようになったが、その作用メカニズムについては不明な点が多い。ゲムシタピンは細胞内で活性化された後DNA鎖に取り込まれ、DNA合成を阻害することで抗腫瘍効果を発揮すると考えられているが、どのように細胞死が誘導されるのかその詳細なメカニズムについてはわかっていない。</p> <p>p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) は様々な細胞外ストレス刺激により活性化されるストレス応答性キナーゼであり、細胞の分化、増殖、生存などに関与している。我々は以前にヒト膵癌由来細胞株においてゲムシタピン曝露によりp38 MAPKの活性化が誘導されること、及びp38 MAPKの選択的阻害剤であるSB203580を用いて活性化を阻害することでゲムシタピン誘導アポトーシスが著明に抑制されることを報告した。本研究では、ヒト膵癌由来細胞株のゲムシタピン誘導細胞毒性におけるp38 MAPK活性化の役割をさらに明らかにするため、dominant negative型p38 MAPK変異体を作成しclonogenic assay法を用いて検討を行った。</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. 薬剤及び処理

ゲムシタピンはEli Lillyより供与された。p38 選択的阻害剤 SB203580 及び SB202190 は Calbiochemより購入した。細胞はDMSO、ゲムシタピン単剤あるいはp38 MAPK選択的阻害剤による前処理との組み合わせにて培養した。

3. 発現ベクター作成と遺伝子導入

ヒトp38 α cDNAをテンプレートとしてsite-directed mutagenesisにより、180番目のスレオニン残基と182番目のチロシン残基をそれぞれアラニン及びフェニルアラニンに変異させ dominant negative型 p38 α MAPK (DN-p38 α) cDNAを作成した。作成したDN-p38 α cDNAにhemagglutinin (HA)エピトープをN末端に導入しpcDNA3.1 (Invitrogen) に組み込み発現ベクターとして使用した。Geneporter 2 (Gene Therapy System)を用いて膵癌細胞株に遺伝子導入を行った。

4. Western blot法

細胞をPBSで洗浄後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100℃で煮沸を行った。11-14% ポリアクリルアミドを用いたSDS-PAGEで等量の試料を電気泳動後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。ブロッキング操作を行った後、1次抗体には抗p38、phospho-p38、phospho-AKT抗体 (Cell Signaling Technology)、抗HA抗体(Babco)、抗 β -Actin抗体(Abcam)を使用した。2次抗体は抗HRP-linked Rabbit-IgG 抗体または抗HRP-linked Mouse-IgG 抗体 (Calbiochem)を用いて反応させた後、enhanced chemiluminescence detection system (NEN Life Science)でシグナルの検出を行った。

5. アポトーシスの検出

ゲムシタピンにより誘導されるアポトーシスの検出を、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma) 染色にて、形態学的に評価を行なった。遺伝子導入24時間後、ゲムシタピンに4時間曝露しトリプシンにて細胞をはがし洗浄後に遠心して細胞を回収した。3.5% paraformaldehydeで20分間固定し、カバーガラス上でDAPI染色を行い蛍光顕微鏡で核の濃縮及び断片化を示すものをアポトーシス細胞として計測した。

6. Clonogenic Assay

100 mm dishにて細胞をSB203580またはSB202190で1時間の前処理を行った後に、ゲムシタピン 10 μ Mにて4時間曝露した。PBSにて洗浄し、以降血清を含むRPMI培地に交換した。Empty vectorまたはDN-p38 α を導入後24時間でゲムシタピン10 μ Mにて4時間処理して洗浄し、以後G418を含むRPMI培地にて発育させた。コロニーは2週間以内に形成された。70%エタノールにて固定し、1.5%クリスタルバイオレットにて染色後、20個以上の細胞で形成されたコロニーの数を計測した。

成 績

1. SB203580及びSB202190処理後膀胱癌細胞におけるゲムシタビン誘導p38 MAPKの活性化阻害

PK1、PCI43の両細胞株において、1 μM 及び10 μM ゲムシタビンで24時間処理することによりp38の活性化が見られ、活性化レベルはゲムシタビン濃度依存性に増強された。次に、20 μM のp38 MAPK選択的阻害剤SB203580またはSB202190で1時間の前処理をした後にゲムシタビン10 μM で4時間の曝露を行ったところ、ゲムシタビンによるp38 MAPKの活性化は著明に抑制された。

2. SB203580処理膀胱癌細胞のゲムシタビン感受性

20 μM のSB203580で1時間前処理した後に10 μM ゲムシタビンで4時間の曝露を行い、その後血清を含む培地で72時間培養しアポトーシスを検討した。SB203580処理後膀胱癌細胞ではゲムシタビンによるアポトーシスの減少を認めた。次に、clonogenic assayを用いてゲムシタビンによる効果を検討した。同様に20 μM のSB203580で1時間前処理した後に10 μM のゲムシタビンで4時間曝露を行い、その後血清を含む培地で2週間培養してコロニー数を計測した。ゲムシタビン曝露によりコロニー形成能の著明低下が見られたのに対して、SB203580処理によってゲムシタビンによるコロニー形成能低下の抑制が認められた。

3. DN-p38 α 導入細胞におけるゲムシタビン曝露後細胞生存率

DN-p38 α 導入細胞では、ゲムシタビンによるp38 MAPK活性化が著明に抑制された。またDN-p38 α 導入細胞では、ゲムシタビン誘導アポトーシスが著明に抑制された。次にclonogenic assayを行いG418耐性コロニーのみ計測したところ、DN-p38 α 導入細胞ではゲムシタビンによるコロニー形成能低下の抑制がみられた。

4. ゲムシタビン曝露時のAkt活性化レベルの変化

p38 MAPK選択的阻害剤による前処理膀胱癌細胞、Empty vector及びDN-p38 α 導入膀胱癌細胞で、ゲムシタビン曝露によるAkt活性化レベルの変化は見られなかった。

考 案

我々は以前にヒト膀胱癌由来細胞株において、ゲムシタビンがJNKやERKシグナルの活性化を誘導せず、p38 MAPKを選択的に活性化することを報告した。本研究では、p38 MAPK活性化の役割についてさらに明らかにするためp38 MAPK選択的阻害剤とDN-p38 α 遺伝子導入を行い、clonogenic assay法を用いて検討した。本研究結果により、ヒト膀胱癌細胞株のゲムシタビン誘導細胞毒性においてp38 MAPK活性化がアポトーシス誘導を促進する役割を果たすことが強く示唆された。近年、p38 MAPKを欠損させた線維芽細胞や心筋細胞は細胞外刺激に対するアポトーシス反応に強い抵抗性を示すこと、多くのヒト癌組織では健常組織に比べてp38 MAPK活性レベルの低いことが報告されており、本研究結果によりp38 MAPKシグナル伝達経路の活性化がアポトーシス促進因子として重要であることが確認された。さらに、本研究結果はゲムシタビンを中心とした癌治

療においてp38 MAPKシグナル伝達経路の活性化が重要な分子標的となる可能性のあることを示唆するものである。本研究では細胞毒性評価法として短期間のassay法とclonogenic assay法を用いて検討したが、clonogenic assay法は生体におけるゲムシタビン誘導細胞毒性をもっともよく反映すると報告されており、clonogenic assay法を用いた本研究結果はp38 MAPK活性化がゲムシタビン誘導細胞毒性に重要であることを強く支持している。

Aktはphosphatidylinositol-3 kinase下流に位置し、アポトーシスに対して抵抗性に作用する強力な生存シグナル分子である。本研究では、Aktがゲムシタビン誘導細胞毒性に関与しているのかどうか、選択的阻害剤で前処理した遺伝子非導入細胞、empty vector、DN-p38 α 導入細胞において検討したが、p38 MAPKが強く活性化されるのに対してAkt活性化レベルには変化を認めなかった。この結果は、ヒト膵癌由来細胞株のゲムシタビン誘導細胞毒性にAktの不活化は関与しておらず、p38 MAPKシグナル伝達経路が関与することをさらに支持するものである。

結 論

ヒト膵癌細胞株のゲムシタビン誘導細胞毒性において、p38 MAPK活性化はアポトーシス促進因子として作用することが示唆された。p38 MAPKを標的とする薬剤との併用により、膵癌のゲムシタビン治療効果を増強できる可能性があると考えられた。

引 用 文 献

- 1) 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.
- 2) Huang, P., Chubb, S., Hertel, L.W., Grindey, G.B., and Plunkett, W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res*, 51: 6110-6117, 1991.
- 3) Page, C., Lin, H. J., Jin, Y., Castle, V. P., Nunez, G., Huang, M., and Lin, J. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res*, 20: 407-416, 2000.

参 考 論 文

- 1) Habiro, A., Tanno, S., Koizumi, K., Izawa, T., Nakano, Y., Osanai, M., Mizukami, Y., Okumura, T., and Kohgo, Y. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 316: 71-77, 2004.

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	小泉 一也
審査委員長 谷口隆信 ㊞			
審査委員 小川勝洋 ㊞			
審査委員 高後裕 ㊞			
審査委員 奥村利勝 ㊞			
学 位 論 文 題 目			
Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase is Necessary for Gemcitabine-Induced Cytotoxicity in Human Pancreatic Cancer cells.			
(ヒト膵癌細胞株におけるゲムシタビン誘導細胞毒性には p38 MAPK の活性化が必要である)			
共著者名：丹野誠志、中野靖弘、羽廣敦也、伊澤功、水上裕輔、奥村利勝、高後裕			
膵癌はその大部分が初期症状に乏しいため、臨床的にはほとんどが進行癌である。従って、その治療/ケアには全身療法としての薬物治療が重要となっている。著者らは近年膵癌に対してその有効性が確認され標準的治療薬として使用されているゲムシタビンに着目し、その作用機序における MAP kinase 活性化の関連について検討した。著者らのグループは既に複数知られている MAP kinase の中でゲムシタビンによって活性化されるのは p38 MAP kinase のみであることを見出しており、今回は p38 MAP kinase に絞って実験をおこなった。実験材料には2種類のヒト膵癌由来の細胞株、PCI43 と PK1、を用いた。			

先ず、ゲムシタビンによる p38 MAP kinase の活性化を検討したところ、いずれの細胞においてもゲムシタビンの濃度依存性に p38 MAP kinase の活性化の指標とされるリン酸化の亢進が認められ、この活性化は p38 MAP kinase 阻害剤によって抑制された。平行してゲムシタビンによって誘導されるアポトーシスについて検討したところ、核の形態変化及びコロニー形成能のいずれのアッセイにおいても、ゲムシタビン誘導アポトーシスは MAP kinase 阻害剤によって抑制された。この結果から、ゲムシタビン誘導アポトーシスにおいては p38 MAP kinase の活性化が重要な因子として機能していることが示唆された。

次いで、活性化に必須のアミノ酸を置換してドミナントネガティブとした p38 MAP kinase のミュータントを作製し、これを PCI43 細胞に導入した。ベクターのみを導入したコントロール細胞と比較して実験をおこなったところ、ゲムシタビン暴露によってコントロール細胞で観察される p38 MAP kinase の活性化はドミナントネガティブ細胞では認められず、同時にゲムシタビン誘導アポトーシスの程度もドミナントネガティブ細胞では著明に減少していた。これらの結果から、ゲムシタビンによる殺細胞作用において p38 MAP kinase の活性化を介したアポトーシスが重要な経路であることが証明された。

ゲムシタビンはシチジン誘導体で DNA 鎖に取り込まれ DNA の修復や DNA 鎖の伸長を阻害することによって抗ガン活性を発揮すると考えられている。しかしながらこれらの DNA 障害作用からアポトーシスに至るまでの経路については不明な点が多く残っている。本研究の結果からゲムシタビン誘導アポトーシスの経路において p38 MAP kinase が特定されたことは非常に意義のあることであり、今後この結果を基にさらに研究が進展することが期待できる。また、p38 MAP kinase は様々なストレスや薬剤などで活性化することが知られており、ゲムシタビンと併用することによりそのアポトーシス誘導作用を増強できる可能性も考えられ、本研究は膀胱癌化学治療の分野において新しい方向性を指し示すものと考えられる。

申請者に対して諮問を行い、当該分野に関する申請者の知識／経験／見識は課程博士に相応しいものであると判断した。以上、論文／諮問による審査の結果、博士に値すると判定したことを御報告申し上げます。

平成17年5月30日