



Title	Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases/Extracellular Signal-Regulated Kinases in Human Hepatocellular Carcinoma
Author(s)	伊藤, 善基
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41283">https://hdl.handle.net/11094/41283</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	伊藤 善基
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14208号
学位授与年月日	平成10年12月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases/Extracellular Signal-Regulated Kinases in Human Hepatocellular Carcinoma. (ヒト肝細胞癌におけるMitogen-activated protein kinases/Extracellular signal-regulated kinasesの活性化)
論文審査委員	(主査) 教授 堀正二 (副査) 教授 門田守人 教授 祖父江憲治

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

細胞が外界の変化に対して様々な遺伝子を発現して応答するためには、細胞外の刺激を核に伝達する細胞内情報伝達機構が必要である。Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase (MAPK)は、種々の細胞増殖因子や発癌プロモーターの刺激で活性化するセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞内情報伝達機構において、増殖シグナルを核へ伝達する一連のキナーゼによる磷酸化カスケード (MAPK カスケード) の中心として重要である。また、数々の癌遺伝子が MAPK を活性化すること、MAPK の活性化が細胞の悪性形質転換を惹起することなどから、細胞の生理的増殖のみならず、癌化・進展への MAPK の関与も示唆されている。そこでヒト肝細胞癌症例における MAPK の活性化とその意義について検討するため、癌部および非癌部における MAPK 活性、MAPK により誘導・活性化を受ける immediate early gene である転写因子群の発現、さらにそれらにより誘導される細胞周期関連遺伝子の発現を解析し、また各種臨床パラメーターとの対比を行った。

#### 【対象と方法】

- (1) 対象：1994年7月5日より1996年11月1日までに肝切除術を受けた、未治療の原発性肝細胞癌症例24症例（男性19例、女性5例）26部位を対象とした。
- (2) 組織ホモジネート作製：肝切除後速やかに組織学的に癌部と非癌部に分別し、glass-Teflon ホモジナイザーを用いて 1% Triton X-100、蛋白分解酵素阻害剤およびフォスファターゼ阻害剤を含む lysis buffer にて組織ホモジネートを作製した。
- (3) MAPK 活性：0.5 mg/ml のミエリン塩基性蛋白 (MBP) および 1 μM protein kinase inhibitor peptide を共重合させた SDS-ポリアクリルアミドゲルにて各組織ホモジネートの電気泳動を行い、in gel kinase assay での MAPK の泳動部位の <sup>32</sup>P の放射活性を、Fujix Bas2000 を用いて解析し、MAPK 活性とした。
- (4) 免疫組織学的検討：MAPK の組織内細胞内の局在を、新鮮凍結切片において抗 MAPK 抗体を用いて検討した。
- (5) 蛋白発現量の検討：各転写因子、細胞周期関連遺伝子の発現は、Western blot 法の後、ECL 法にて検出し、デンシ

トメーターにて解析した。

(6)遺伝子増幅の検討：cyclin D1 の遺伝子増幅は、cyclin D1 cDNA をプローブとして EcoRI 処理 genomic Southern blot 法にて検討した。internal control としては beta-actin cDNA を用いた。

#### 【成績】

(1)非癌部と比べて癌部では MAPK 活性が26部位中18部位 (69%) で上昇しており、その活性の上昇は有意であった ( $p=0.0146$ , paired t 検定)。MAPK の蛋白発現亢進は、26部位中17部位 (65%) に認められたが、癌部非癌部間で発現に有意差を認められなかった ( $p=0.1010$ , paired t 検定)。一方癌部における MAPK 活性および蛋白発現の対非癌部比 (T/N 比) は、それぞれ $1.40 \pm 0.67$ 倍,  $1.71 \pm 1.31$ 倍であった。

(2)免疫組織学的検討では、癌部での MAPK の活性化が認められた症例において、MAPK が癌部においては細胞質に比して核に強く染色されたが、非癌部においては細胞質と核との間には染色性に差がなかった。このように、in vitro の系で報告されている MAPK 活性化による MAPK の核内への移行が、ヒト肝細胞癌組織においても確認された。

(3)活性化 MAPK の核内への移行は、各種転写因子を誘導・活性化すると報告されているため、次に癌部での転写因子の蛋白発現を検討した。Fos の発現亢進は26部位中12部位 (46%) において認められ、Fos の蛋白発現量と MAPK 活性との間に有意の相関関係を認めた。Jun の発現亢進は26部位中13部位 (50%) で認められたが、Jun の発現と MAPK 活性との間には一定の傾向は認められなかった。

(4)G1 から S 期への細胞周期の進行に重要な役割を果たす G1 サイクリンの一つである cyclin D1 は、発癌との関連が報告されている。そこで cyclin D1 の非癌部に対する癌部での蛋白発現増強を検討すると、26部位中17部位 (65%) で認められた。さらに遺伝子増幅を解析するとゲノム DNA の得られた25部位中 3 部位 (12%) に認められた。一方、遺伝子増幅を認めない22部位において MAPK や転写因子と cyclin D1 との関連を検討すると、癌部において MAPK 活性と cyclin D1 の蛋白発現量との間、および Fos の蛋白発現量と cyclin D1 の蛋白発現量との間に有意の正の相関関係を認めた。

(5)MAPK 活性と各種臨床パラメーターとの関連においては、腫瘍径の増大に伴い癌部での MAPK 活性比が上昇する傾向が認められた。さらに腫瘍径20 mm で 2 群に分けて検討すると、径20 mm 以上の腫瘍において、それ未満のものと比し有意の活性上昇を認めた。一方、MAPK 活性と肝細胞癌の分化度、もしくは stage 分類との間には明らかな相関関係を認めなかった。

#### 【総括】

多くのヒト肝細胞癌症例における MAPK の恒常的な活性化は、転写因子、細胞周期関連遺伝子の発現誘導を通じて、ヒト肝細胞癌における増殖・進展の一翼を担っていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

肝細胞癌は、主要な悪性新生物であり、また治療に難渋する癌の一つであり、その病態および治療に関して様々な研究が行われてきている。

本研究は、細胞内情報伝達系に着目し、ヒト肝細胞癌症例において、非癌部に比し癌部で Mitogen-activated protein kinases/Extracellular signal-regulated kinases (MAPK) が活性化され、その活性化が転写因子 c-fos、細胞周期関連遺伝子 cyclin D1 の発現・誘導に関与していること、および肝細胞癌の腫瘍径の増大に伴って MAPK 活性の亢進を認めることから、MAPK の恒常的活性化が、転写因子や細胞周期関連遺伝子の発現誘導を通じて、ヒト肝細胞癌における増殖・進展の一翼を担っていることを示した。MAPK は主要な細胞内情報伝達系である MAPK カスケードへの様々な増殖刺激を統合して核へ伝達する役割を果たしており、MAPK の制御によって MAPK カスケードの上流からのあらゆる増殖刺激の制御が可能となると考えられる。

本研究は、肝細胞癌の病態の解明および、肝細胞癌に対する細胞内情報伝達系の制御による治療という治療戦略に新たな方向性を与えるもので、臨床的にも極めて意義深いものと考えられる。よって、学位の授与に値するものと判断する。