The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Involvement of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Cascade in Human Hepatocellular Carcinoma
Author(s)	伊與田, 賢也
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45339
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【3】

氏　　名	伊與田　賢　也（いよだ　けんや）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　18013　号
学位授与年月日	平成15年4月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科先端応用医学専攻
学　位　論　文　名	Involvement of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Cascade in Human Hepatocellular Carcinoma （ヒト肝細胞癌におけるp38 MAPKカスケードの関与）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　林　　紀夫 （副査） 教　授　祖父江憲治　　教　授　門田　守人

論　文　内　容　の　要　旨

【目　　的】

癌細胞の特性として、無制御な細胞増殖能と細胞死回避能という二つが挙げられる。我々はこれらの特性を担う分子機構について、細胞内情報伝達機構の面より解析してきた。これまでに原発性肝細胞癌（HCC；以下、肝癌）において、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily の中でも古典的 MAPK と呼ばれる ERK1/2 が、その恒常的な活性化を通じていくつかの転写因子や細胞周期を調節して細胞増殖に働くことを報告してきた。また、細胞死回避については、生存シグナルの活性化が、Bcl-2 family の一つである BAD のリン酸化を介し、アポトーシス回避能に関与している可能性を明らかにしてきた。一方、ストレスなどで活性化される MAPK superfamily と、その上流の MAPK kinase（MKK）については、癌細胞における役割はいまだに明らかでない。そこで今回、肝癌におけるこれらストレス応答性 MAPK である p38MAPK とその上流の MEK6 について検討した。

【方　　法】

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2、HuH7 に p38 MAPK を活性化する MKK6 の constitutive active mutant（MKK6 (Glu)）を transient transfection した細胞を用いて、細胞数やアポトーシスについて検討した。p38 MAPK と MKK6 の活性および発現は *in vitro* kinase assay と Western blot 法で、細胞数は MTT 法を modify した WST-1 法で、アポトーシスはフローサイトメトリーによる sub G1 法で測定した。また、アポトーシス実行因子である caspase について、caspase-8 を Western blot 法と colorimetric assay で、アポトーシスの最終実行因子である caspase-3 を colorimetric assay で測定した。さらに、肝癌の手術症例 20 例の抽出標本を癌部（T）と非癌部（NT）に分けたヒト肝癌組織において、p38 MAPK 活性を *in vitro* kinase assay により、MKK6 活性を特異的リン酸化抗体を用いた Western blot 法により検討した。また、caspase-3 を colorimetric assay kit で測定した。

【成　　績】

MKK6（Glu）を transient transfection した肝癌細胞ではコントロールに比し細胞数は有意に減少し、フローサイトメトリーで細胞のアポトーシスも確認された。さらに細胞質へのチトクローム c の放出と caspase-3 の活性上昇が確認された。これに対して、p38 MAPK の特異的阻害剤 SB203580 を投与することで、MKK6（Glu）の影響はすべ

て消失した。Bid や caspase-8 についてはその活性に変化はなく、肝癌細胞では p38 MAPK からこれらを介さず、ミトコンドリアに作用してアポトーシスをおこしている可能性が示唆された。さらに、ヒト肝癌組織では p38 MAPK 活性は HCC 20 例中 15 例で NT に比べて、T で減弱していた。MKK6 活性も HCC 20 例中 14 例で NT に比べて、T で減弱していた。p38 MAPK と MKK6 の蛋白発現には T と NT で差は認めなかった。T の p38 MAPK 活性と MKK6 活性の間には有意な正の相関関係を認めた。さらに正常肝に比べると、p38 MAPK、MKK6 活性は NT でも同等もしくはやや減弱しており、これらカスケードの不活性化が肝細胞の癌化に関与している可能性が示唆された。また、T の p38 MAPK 活性と MKK6 活性は腫瘍径 2 cm 以下の症例に比べ、2 cm 以上の症例では有意に低く、腫瘍の増大につれて、活性が減弱する傾向が認められた。

【総　括】

MAPK superfamily である p38 MAPK は、肝癌細胞においてチトクローム c の放出を介して caspase-3 を活性化し、アポトーシスを誘導した。このことから、肝癌における p38 MAPK、MKK6 活性の減弱化が、アポトーシス回避の一翼を担っていることが示唆された。今後、これらを特異的に活性化することで、癌細胞をアポトーシスに導く治療法への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

ストレスなどで活性化される MAPK superfamily と、その上流の MAPK kinase（MKK）については、癌細胞における役割はいまだに明らかでない。今回の発表は、肝癌におけるこれらストレス応答性 MAPK である p38 MAPK とその上流の MKK6 について検討したものであった。MKK6（Glu）を transient transfection した肝癌細胞では細胞数は有意に減少し、フローサイトメトリーで細胞のアポトーシスも確認された。さらに細胞質へのチトクローム c の放出と caspase-3 の活性上昇が確認された。一方、p38 MAPK の特異的阻害剤 SB203580 を投与することで、MKK6（Glu）の影響ははすべて消失した。Bid や caspase-8 についてはその活性に変化はなく、肝癌細胞では、p38 MAPK からこれらを介さず、ミトコンドリアに作用してアポトーシスをおこしている可能性が示唆された。さらに、ヒト肝癌組織では p38 MAPK 活性は HCC 20 例中 15 例で非癌部（NT）に比べて、癌部（T）で減弱していた。MKK6 活性も HCC20 例中 14 例で NT に比べて、T で減弱していた。T の p38 MAPK 活性と MKK6 活性の間には有意な正の相関関係を認めた。また、T の p38 MAPK 活性と MKK6 活性は腫瘍径 2 cm 以下の症例に比べ、2 cm 以上の症例では有意に低く、腫瘍の増大につれて、活性が減弱する傾向が認められた。以上、肝癌における p38 MAPK、MKK6 活性の減弱化が、アポトーシス回避の一翼を担っていることが示唆された。本論文は、肝癌における p38 MAPK 活性と MKK6 活性の役割を明らかにしたものであり、学位の授与に値すると考えられる。