



Title	Role of JNK-AP1 pathway in Chemotherapy drug sensitivity/resistance and Identification of AP-1 target genes involved in drug sensitivity
Author(s)	早川, 潤
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46319
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

氏 名	はや かわ じゅん 早 川 潤
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 19756 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 7 月 22 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	Role of JNK-AP1 pathway in Chemotherapy drug sensitivity/resistance and Identification of AP-1 target genes involved in drug sensitivity. (DNA 傷害型抗癌剤感受性における JNK-AP1 経路の役割とその標的遺伝子の同定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村田 雄二 (副査) 教 授 奥山 明彦 教 授 高井 義美

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

Cisplatin などの DNA 傷害型抗腫瘍薬剤は、化学療法剤の Key drug として臨床上繁用され婦人科領域では卵巢癌の治療成績向上に大きく貢献している。しかしながら、Cisplatin に当初反応していた腫瘍が耐性となることも多く、このことが卵巢癌の予後を不良とする大きな要因となっている。我々は以前より Cisplatin の耐性化機構に着目し、MAP kinase family である JNK が関与していることを報告してきた。DNA damage などの様々な Cell stress に応答する JNK は、AP-1 転写因子 (c-Jun、ATF2) をリン酸化、転写活性化し、多様な細胞応答をプロモートする役割を担っているが、そのプロセスに関わる標的遺伝子についての知見は乏しい、そこで本研究は、JNK-AP-1 pathway の Cisplatin 感受性への関与とそのメカニズム、また、その過程にかかわる標的遺伝子の同定を研究テーマとした。

[方法]

1. DNA damaging agent である Cisplatin、また、コントロールとして Transplatin (DNA damage を誘導しない Cisplatin の異性体) を用い、JNK の活性化及びその基質である転写因子 cJun および ATF2 の転写活性などを Western blotting 法、In vitro kinase assay 及び Luciferase promoter assay にて検討。[ovarian cancer cell line (Caov-3) または breast cancer cell line (BT474) を使用]
2. DNA damage による JNK-cJun/ATF2 pathway の活性化が細胞の Cisplatin 感受性に関与しているかどうかを、JNK-cJun/ATF2 inhibitor (siRNA for JNK、Dominant negative constructs (D.N.JNK、D.N.cJun、D.N.ATF2)) を用い、MTS による Cell viability assay にて検討。
3. JNK-cJun/ATF2 pathway の活性化が、DNA 修復の亢進に関与しているかどうかを PCR stop assay にて検討。
4. Cisplatin 誘導の DNA damage による JNK-cJun/ATF2 pathway の活性化が、どのような遺伝子の発現制御をしているかを検討。

(JNK-cJun/ATF2 pathway の薬剤感受性に関わる標的分子の同定)

活性化した cJun/ATF2 の標的遺伝子を同定するため、クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) と DNA マイクロアレイを融合した Promoter Microarray system を開発。

アポトーシス関連、DNA 修復遺伝子などの腫瘍関連の遺伝子を中心に約 4000 種の遺伝子のプロモーター領域を

PCR 増幅、精製し、ハイブリッドスライド上にアレイプリンティングしたマイクロアレイチップを作製し、ChIP 法により抽出した活性化した cJun または ATF2 が細胞内で結合していた DNA を Cy5 にて色素ラベルし、アレイチップ上で Hybridization を施行。シスプラチン投与群と無投与群をそれぞれ異なる色素 (Dye-3 と Dye-5) でラベルし、比較実験を行い、シスプラチンにより活性化する AP-1 の標的遺伝子を同定した。

5. 同定した遺伝子の転写因子 binding profile が JNK 依存性かどうかを検討するため、JNK inhibitor (SP600125 および siRNA for JNK) を用い、上記同様 Promoter microarray を施行した。
6. 同定した遺伝子 profile の発現確認—Promoter array で同定した cJun/ATF2 の標的遺伝子の profile と Cisplatin 投与による mRNA の発現 Profile (Affymetrix Oligo microarray による) の 2 群を比較し、cJun/ATF2 が結合し、さらに Cisplatin により発現誘導された Functional gene を同定し、
 - a) mRNA レベルでの発現を、定量的 PCR 法を用い確認。
 - b) 蛋白レベルでの発現を Western Blotting 法にて確認。

[成績]

- ① Cisplatin による DNA damage により、AP-1 component である cJun 及び ATF2 は、JNK 依存性にリン酸化され、転写活性化する。
- ② JNK-AP1 pathway を抑制すると、Cisplatin 感受性が亢進し、耐性が解除される。
- ③ DNA damage による JNK-AP1 pathway の活性化は、DNA 修復を亢進することで薬剤感受性に関与している。
- ④ 転写因子の標的遺伝子をハイスループットに同定解析する新しい技術 Promoter array を開発し、210 の cJun の Target 遺伝子および 181 の ATF2 の Target 遺伝子を同定、それらの大多数 (121) は、cJun、ATF2 双方の Target 遺伝子であった。
- ⑤ ATF、cJun の binding profile は、JNK 依存性であり、プロモーター上への binding profile とその遺伝子の発現 (expression profile) は有意に相関関係にあった。また、検定としてプロモーター結合と mRNA の発現、また、蛋白の発現には、相同性があった。
- ⑥ 多くの DNA 修復遺伝子が、JNK-AP1 の Target 遺伝子として同定された。(MSH2、MSH6、MLH1、PMS2、XPA、RAD23B、ERCC1、ERCC3、DMC1、ATM、RRM2)

[総括]

JNK-cJun/ATF2 pathway は、DNA 修復遺伝子の発現を統合的に調整し、DNA 修復を促進することにより、Cisplatin に対する薬剤感受性機構に重要な役割を担っていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Cisplatin などの DNA 傷害型抗腫瘍薬剤は、化学療法剤の Key drug として臨床上に多用され婦人科領域では卵巣癌の治療成績向上に大きく貢献している。しかしながら、Cisplatin に当初反応していた腫瘍が耐性となることも多く、このことが卵巣癌の予後を不良とする大きな要因となっている。我々は以前より Cisplatin の耐性化機構に着目し、MAP kinase family である JNK が関与していることを報告してきた。そこで本研究は、JNK の基質である転写因子 cJun/ATF2 の Cisplatin 感受性への関与とそのメカニズム、また、その標的遺伝子の同定を研究テーマとし、Cisplatin による DNA damage で活性化される JNK-cJun/ATF2 pathway は、DNA 修復遺伝子の発現を統合的に調整し、DNA 修復を促進することにより、Cisplatin に対する薬剤感受性機構に重要な役割を担っていることを示唆した。

以上、この研究をまとめた論文により、学位の授与に値すると考えられる。