

論文の内容の要旨

題名 : MAPK Superfamily Plays an Important Role in
Daunomycin-induced Apoptosis of Cardiac Myocytes
(抗癌剤ダウノマイシン (DM)による心筋細胞アポトーシスの発症
機序——MAPキナーゼ (MAPK) スーパーファミリーの関与)

氏名 朱 偉東

(序論)

抗癌剤ダウノマイシン (DM) による非可逆性心筋障害は致死的であり、その病態解明と予防・治療法の開発が急務となっている。最近、心不全やある種の心筋症において心筋細胞にアポトーシスが起きていることが報告され、その病態形成における役割が注目されている。また、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の新しいファミリーである c-Jun NH₂-terminal kinases (JNKs) と p38MAPK が同定され、その働きのひとつとしてアポトーシスとの関連が報告されている。一方、われわれは、DM による心筋障害の一因として知られている活性酸素が p38MAPK を介して培養心筋にアポトーシスによる細胞死を誘導することを報告した。そこで今回、DM による心筋細胞アポトーシスと MAP キナーゼファミリーの関係をさらに詳細に解析した。

(方法)

[1] MAP キナーゼ活性測定

Wistar 系新生仔ラット培養心筋細胞を、 10^{-4} M の DM で刺激した。ERKs と p38MAPK は myelin basic protein (MBP) を、JNKs は c-Jun 蛋白を基質にしてその活性を測定した。さらに、p38MAPK についてはリン酸化 p38MAPK を特異的に認識する抗体によってそのリン酸化について検討した。

[2] 心筋細胞のアポトーシスの検出

A, DM 最終濃度 10^{-6} M で 24 時間の刺激を行い、4% パラフォルムアルデヒドにて固定し、心筋細胞の細胞質をミオシンに対する抗体を用いて、また核を Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法にて二重染色を行った。

B, DNA の電気泳動を行い、DNA fragmentation 形成の有無を調べた。

[3] MAP キナーゼ活性と心筋細胞のアポトーシスの *in situ* の検出

wild type の Hemagglutinin (HA)-tagged ERK2 と Flag-tagged p38MAPK plasmid を培養心筋細胞に transfect して HA または Flag にたいする抗体にて *in situ* の蛋白発現を検討した。さらに transfect された心筋細胞について TUNEL 法によりアポトーシスを検討した。

(結果)

[1] 心筋細胞のアポトーシス

10^{-6} M DM 刺激により、心筋細胞に多数の TUNEL 陽性像 (24%) が確認された。コントロールの培養心筋の染色像では TUNEL 陽性像 (3%) はほとんど確認されなかった。アガロースゲル電気泳動法では、アポトーシスに特徴的な DNA ladder formation が 10^{-6} M DM 刺激で見られた。

[2] MAP キナーゼの活性化

次に DM に誘導されたアポトーシスの形成機序を解析するために、細胞の増殖・分化・アポトーシスに重要な役割を果たしている MAP キナーゼファミリーの活性について検討した。MAP キナーゼのうち、ERKs、JNKs、p38MAPK はいずれも活性化されたが、ERKs は 15 分にその活性のピークを認め、JNKs と p38MAPK は 30 分に認めた。また 10^{-6} - 10^{-3} M の範囲において濃度依存性に活性化された。活性化された ERKs と p38MAPK は核内へ移動した。

次に ERKs と p38MAPK の上流について解析を行った。種々の細胞において Ras、Raf-1 は成長因子などの刺激により ERKs の上流で活性化されることが知られているが、Ras、Raf-1 の dominant-negative mutant (D.N.) の過剰発現によって、DM 刺激による ERKs の活性化は抑制された。一方、DM 刺激による p38MAPK の活性化は Ras、Raf-1 の D.N. では抑制されず、Rho ファミリー (RhoA, Rac1, Cdc42) の D.N. や Rho を不活性化の状態のままにしてその機能を抑制する Rho GDP dissociation inhibition (RhoGDI)

の過剰発現により部分的に抑制された。また逆に Rho ファミリーの抑制は ERKs の活性化に影響を与えなかった。このことから ERKs の上流に Ras, Raf-1 蛋白が存在し、p38MAPK の上流に Rho 蛋白が存在することが示唆された。

さらに DM による ERKs と p38MAPK の活性化のメカニズムを明らかにするために、フリーラジカル消去剤 (OH の消去剤 DMSO; H_2O_2 を還元する Catalase; OH, H_2O_2 と O_2^- をともに消去する N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (MPG)) 及び細胞内及び細胞外 Ca^{2+} キレート剤 BAPTA と EGTA にて前処置すると、ERKs と p38MAPK の活性化が抑制された。一方、protein kinase C、protein kinase A、チロシンキナーゼの阻害薬の前処置では、ERKs と p38MAPK の活性化は抑制されなかった。

[3] MAP キナーゼの役割

DM 刺激により心筋細胞の一部は細胞質の縮小、核の濃染、縮小といった形態学的にアポトーシスを示し、DNA の ladder 形成も認められた。ERKs の特異的な阻害剤である PD98059 の前処置によりアポトーシスを示す細胞数は増加し、DNA の ladder の形成は増加した。逆に、p38MAPK の特異的な阻害剤である SB203580 の前処置によりアポトーシスを示す細胞数は減少し、DNA の ladder の形成も減少した。

さらに HA-ERK2 及び Flag-p38MAPK を transfect した心筋細胞にて DM の刺激により HA-ERK2 及び Flag-p38MAPK は活性化され、核内へ移動された。核内で過剰発現した p38MAPK は心筋細胞のアポトーシスを誘導した。

(考察)

近年、細胞内の最も基本的なシグナル伝達経路を構成すると考えられてきた MAP キナーゼのファミリー (ERKs, JNKs, p38MAPK) がアポトーシスと関連しているとの報告がいくつかなされている。in vitro の研究により、ERKs の活性化が心肥大や心肥大時の遺伝子発現に重要であると報告され、JNKs/p38MAPK の活性化がアポトーシスの誘導に重要であると報告された。今回の結果により、ラットの培養心筋細胞における抗癌剤 DM 刺激によりアポトーシスが起きていることが生化学的及び形態学的に証明された。DM により産生されたフリーラジカル (H_2O_2 と OH) が心筋細胞障害を引き起こすことがフリーラジカル消去剤により明らかとなったが、その過程において ERKs は細胞保護に、p38MAPK は障害に働いていることが示唆された。ERKs の上流には Ras-Raf-1 が、p38MAPK の上流には Rho が存在することも判明した。

Rho 蛋白は最近、細胞の骨格や接着を制御する機能を有することで注目されてきた低分子量 G 蛋白であり、種々の細胞で JNKs 及び p38MAPK のカスケードの上流にあることが報告されている。DM による p38MAPK の活性化を Rho 蛋白の dominant-negative mutant が抑制することより、心筋細胞における DM 刺激のシグナル伝達においても重要な役割を

果たしていることが示唆された。どのように Rho 蛋白が活性化されるか、また p38MAPK を活性化するかは今後の課題である。

Ca²⁺ は細胞内の情報伝達系の中で普遍的なシグナル物質として働いている。細胞内或いは細胞外 Ca²⁺ キレート剤にて前処置すると、ERKs と p38MAPK の活性化が同時に抑制されたことから、Ca²⁺ は ERKs と p38MAPK の共通の上流に存在することが示唆された。Ca²⁺ が DM による MAPK ファミリーの活性化にどのように関与するのかを今後検討する予定である。また、どのような機序で ERKs が細胞保護に、p38MAPK がアポトーシス誘導に働いているかについても、今後の検討課題である。