

審査の結果の要旨

氏名 朱 偉 東

本研究は、抗癌剤ダウノマイシン (DM) によって生じる心筋障害の発生機序を解明するため、ラット培養心筋細胞にて、最近提唱された細胞死-アポトーシスとの関連及びその細胞内情報伝達系を明らかにすることを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 培養心筋細胞において、 10^{-6} M DM 刺激により、心筋細胞に 24% の TUNEL 陽性像が確認された。コントロールの培養心筋の染色像では TUNEL 陽性像はほとんど確認されなかった (3%)。アガロースゲル電気泳動法では、 10^{-6} M DM 刺激によりアポトーシスに特徴的な DNA ladder 形成が認められた。
2. 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ところ、MAP キナーゼのうち、ERKs、JNKs、p38MAPK は DM 刺激によっていずれも活性化されたが、その活性のピークは ERKs では 15 分に、また、JNKs と p38MAPK では 30 分に認められた。また DM の濃度 10^{-6} - 10^{-3} M の範囲においてこれらの MAP キナーゼ濃度依存性に活性化され、さらに活性化された ERKs と p38MAPK は核内へ移動することが示された。
3. ホルボールエステル (TPA) 又は calphostin C により PKC の活性をダウンレギュレーション又は抑制しても、あるいは RpcAMP により PKA の活性を抑制しても、さらにチロシンキナーゼ特異的な阻害薬である tyrphostin と genistein によりチロシンキナーゼの活性を抑制しても、DM による ERKs と p38MAPK の活性化は全く抑制されなかった。従って、心筋細胞において、DM による ERKs と p38MAPK の活性化は、PKC、PKA とチロシンキナーゼの活性化を介さないことが示された。
4. フリーラジカル消去剤 (\cdot OH の消去剤 DMSO ; H_2O_2 を還元する Catalase ; \cdot 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、DM による ERKs と p38MAPK の活性化が抑制されることが示された。
5. HA-ERK2、または Flag-p38MAPK と Ras の活性化を抑える dominant negative mutant of Ras (D.N.Ras)、Raf-1 の活性化を抑える D.N.Raf-1、または 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) を共導入した後、DM により ERKs と p38MAPK の活性化を検討した。D.N.Ras と D.N.Raf-1 はともに、DM に

よる ERKs の活性化を抑制したが、DM による p38MAPK の活性化は抑制しなかった。一方、DM により p38MAPK の活性化は D.N.Rho 及び RhoGDI によって抑制されたが、ERKs の活性化は抑制されなかった。以上のことから 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。

6. DM 刺激により心筋細胞の一部は細胞質の縮小、核の濃染、縮小といったアポトーシスの形態を示し、DNA 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 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 ladder の形成も減少した。

さらに HA-ERK2 及び Flag-p38MAPK を導入した心筋細胞を DM 刺激すると HA-ERK2 及び Flag-p38MAPK は活性化され、核内へ移動した。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。

以上、本論文において、ラット培養心筋細胞では DM による心筋障害がアポトーシスを介することがはじめて明らかにされた。さらに、アポトーシスを引き起こす DM の情報伝達系を新しい手法 dominant-negative 法と特異的阻害薬を用いて詳細に検討し、心筋細胞特異的な情報伝達経路の解明が行われた。DM により産生されたフリーラジカル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 MAP キナーゼファミリーのうち 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。また、ERKs の上流には Ras-Raf-1 が、p38MAPK の上流には Rho が存在することも明らかとなった。本研究は、DM によって生じる心筋障害の発生機序及び細胞内情報伝達系の解明に大きく貢献するものであり、その治療法の開発にも役立つと期待される。また、心筋細胞特異的な情報伝達経路の解明は、視野を広げれば、外界からの刺激に対する細胞の反応が、刺激と細胞の種類によって異なるということを端的に示しており、医学にとどまらず広く生物学的立場からも注目され、学位の授与に値するものと考えられる。