

論文の内容の要旨

論文題目 Signal Transduction through SAPK/JNK in Heat-induced Apoptosis and Thermotolerance of U937 Cells

和訳 U937細胞の温熱誘発細胞死および温熱耐性におけるSAPK/JNKを介するシグナル伝達の解析

指導教官 鈴木 紀夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

生体物理医学専攻

氏名 劉 長青

「背景と目的」

温熱処理による癌治療の歴史は長く、放射線感受性の低いS期細胞や低酸素細胞が温熱に高い感受性を示す特性ゆえに、しばしば放射線と組み合わせて癌治療に用いられている。しかしながら、その生物作用の分子機構や標的分子についてはまだ十分解明されていないのが現状である。温熱処理に応答して細胞は細胞死や温熱耐性などを引き起こす。細胞死は細胞の膨化を伴うネクロシスと細胞の縮小や核の断片化を伴うアポトーシスに大別されることが多い。42～45℃前後の温熱処理はCaspase依存的アポトーシス様の細胞死を起こすことが種々の細胞で報告されている。一方、温熱処理を行った後、時間をおいて再び熱処理を施すと細胞は熱に対して温熱耐性を持つようになる。温熱耐性の出現は癌の温熱治療上一つの問題点とわかれてきた。

温熱誘発細胞死におけるp53経路についての研究は多いが、SAPK/JNK経路については

十分解明されていない。SAPK/JNKはストレス応答によって活性化されるMAPキナーゼファミリーの一つである。MAPキナーゼは、酵母からヒトに至る真核生物に広く保存されており、MAPKKK-MAPKK-MAPKの3種のキナーゼにより情報伝達を実行する。MAPKKはMAPKKKによってリン酸化され活性化し、その結果MAPKをリン酸化する。リン酸化されたMAPKは活性化し、転写因子などをリン酸化する。これらのキナーゼにはSAPK/JNKの他に、p38 MAPK, ERK1/2などいくつかのファミリーが存在する。温熱によってSAPK/JNK、p38 MAPKが活性化することから、温熱誘発アポトーシスにもSAPK/JNK、p38 MAPK経路の関与の可能性が示唆されてきた。さまざまな刺激でSAPK/JNK、p38 MAPK経路の両者同時に活性化するという報告が多いが、SAPK/JNK経路のみ或いはp38 MAPK経路のみ活性化される例もある。細胞によって、また、ストレスによって異なると考えられるが、温熱に関するMAPキナーゼの研究は限られている。最近われわれはJNK1のドミナントネガティブの導入実験で、温熱によるアポトーシスにはJNK1の活性化が重要であることを示した。

本研究はp53 nullのU937細胞を用い、温熱による細胞死及び温熱耐性におけるSAPK/JNKとp38 MAPK経路の活性化の役割を中心に解析を試みた。

「材料と方法」

- ① 材料としては、対数増殖期のヒト単芽球性リンパ腫細胞株U937を用いた。温熱処理は $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の恒温水槽にフラスコを沈めることにより行った。温熱耐性実験では細胞を 44°C 、15分の前処理後、 37°C に8時間或いはそれぞれの図に示した時間置き、再び温熱処理（ 44°C 、30分）を行った。
- ② 酸性スフィンゴミエリナーゼ阻害剤(D609)は直接培地中に添加し、 37°C 、30分間処理してから遠心によりD609取り除き、新しい培地を加え、 37°C で2時間置き、温熱処理を行った。p38 MAPKの阻害剤SB203580は温熱処理1時間前に培地に添加した。
- ③ 細胞死或いは生存率には0.2%エリスロシンB染色による色素排除試験、Annexin V, PI二重染色後FCM早期アポトーシス検出法及びWestern法によるPro-caspase-7の活性化

及びPARPの切断、蛍光顕微鏡観察によるPI染色した細胞の核凝縮などの核変形を指標とした。

- ④ MAPK family (SAPK/JNK54/46, p38 MAPK) の活性化はそれぞれのリン酸化型抗体を用いてWestern法により行った。

「結果と考察」

① U937細胞における温熱誘発細胞死とSAPK/JNK, p38 MAPKの活性化

温熱処理 (44℃、30分) により、U937細胞では急速に生存率の低下が見られ、(1) 細胞膜のリン酸脂質の構成成分のファスファスオスファチジルセリンが細胞膜内層から外膜に移行する事がAnnexin V 染色で確認された。(2) PI 染色した細胞の蛍光顕微鏡下、アポトーシス様の核凝縮、(3) Pro-caspase-7やPARPの切断も温度依存のおよび時間依存的に確認できた。次に、温熱により細胞死を引き起こす際、SAPK/JNK, p38 MAPK活性化の変化を調べた。43℃から45℃までの温熱処理によってSAPK/JNK, p38 MAPKの活性化がほぼ同時に見られ、さらに、その活性化とPro-caspase-7の切断にも時間的関連性が認められた。42℃で180分までにSAPK/JNKおよびp38 MAPKの活性化もPro-caspase-7の切断も見られなかった。44℃あるいは45℃の温熱処理ではSAPK/JNKおよびp38 MAPK活性化が処理後15分から見られ、Pro-caspase-7の活性化より10分から15分ほど先行して出現した。これらの結果はU937細胞の温熱誘発細胞死にSAPK/JNKおよびp38 MAPKのリン酸化が関与する可能性を示す。

- ② 温熱耐性を獲得したU937細胞ではSAPK/JNKや p38 MAPKのリン酸化が抑制されていた。

44℃、15分温熱処理後、37℃に6~20時間培養して、温熱耐性を誘導したところで44℃、30分温熱処理した場合、SAPK/JNK、p38 MAPK、HSP27のリン酸化は前処理しなかった場合に比べ、顕著に抑えられ (SAPK/JNKが最も顕著)、Pro-caspase-7及びPARPの切断や温熱誘発細胞死は有意に低下していた。また、44℃、15分温熱処理によるSAPK/JNK, p38 MAPK活性化の低下がHSP70の蓄積と並行して起こることから、HSP70の蓄積がSAPK/JNK, p38 MAPK活性化を抑制する可能性も考えられる。これらの結果から、U937

細胞の温熱耐性の獲得はSAPK/JNK (p38 MAPK、HSP27) のリン酸化の低下が要因の一つとなっていることが示唆された。

③ p38 MAPK 特異的阻害剤SB203580は温熱誘発アポトーシスを抑制しなかった。

p38 MAPK 特異的阻害剤SB203580存在下に温熱処理するとp38 MAPK活性が阻害され、下流のHSP27のリン酸化も完全に抑えたが、Pro-caspase-7の切断及び温熱誘発細胞死は阻害されなかった。SB203580前処理による温熱誘発SAPK/JNKのリン酸化の程度に顕著な違いがなかった。従って、p38 MAPK経路はU937細胞の温熱誘発細胞死に重要でない可能性が示された。

④ SAPK/JNK活性化をD609で抑制すると温熱誘発アポトーシスも抑制された。

温熱処理すると、細胞がストレス応答して脂質セカンドメッセンジャーであるセラミドの合成量が増加し、SAPK/JNKが活性化すると考えられている。細胞膜通過性合成C₂-ceramideでU937細胞を処理した場合も、SAPK/JNKのリン酸が見られ、Pro-caspase-7やPARPの切断、細胞死が起きた。セラミドの合成に関わる酵素の一つが酸性スフィンゴミエリナーゼ (aSMase) である。セラミドを低下させるため、aSMaseの阻害剤D609で処理すると顕著な温熱防護効果が示された。D609 (50µg/ml) 30分の前処理により、SAPK/JNKのリン酸化は著しく低下し、温熱誘発Pro-caspase-7及びPARPの切断、細胞死も有意に抑制された。その効果はD609の濃度に依存した。一方、D609前処理はp38 MAPKとその下流のHSP27の温熱によるリン酸化やHSP70の蓄積には顕著な影響を示さなかった。

以上の結果から、U937細胞における温熱誘発アポトーシス様細胞死及び温熱耐性においてはSAPK/JNK経路、p38 MAPK経路とも活性化してみえるが、重要なシグナル伝達経路はSAPK/JNKであることが示唆された。