



Involvement of egf receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in hacat keratinocytes after uvb

芦田, 雅士

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2743

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002743>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 9 5 】

氏 名 ・(本 籍) 芦田 雅士 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1490号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

Involvement of EGF receptor activation in the induction of
cyclooxy genase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB
(HaCaT細胞では紫外線照射後のシクロオキシゲナーゼ
-2誘導にEGF受容体が関与する)

審 査 委 員

主 査 教 授 市橋 正光

 教 授 杉村 和朗

 教 授 前田 盛

はじめに

プロスタグランジン (PG) は、膜のリン脂質より遊離したアラキドン酸が、シクロオキシゲナーゼ (COX) の作用により変換されて産生される。PGの生理的な作用としては、細胞増殖刺激、免疫抑制、血管増生及びアポトーシス抑制など悪性腫瘍の発生、増殖及び転移を促進する作用があるとされており、PG及びそれを産生するCOXは発癌において重要な要素として注目されている。

COXにはCOX-1とCOX-2の2つのisoformがあることが知られている。COX-1は多くの細胞に恒常的に発現しており、housekeeping geneとされている。一方、COX-2はinducible geneであり様々な刺激により発現が誘導され、各種悪性腫瘍においてその重要性が報告されている。

皮膚の悪性腫瘍においても、紫外線 (UV) によりヒトやマウスの表皮細胞でCOX-2が発現することや、COX-2特異的阻害剤によりマウスでの紫外線による発癌が抑制されることが報告されており、紫外線発癌におけるCOX-2の重要性が示唆されている。

今回、我々は紫外線B波 (UVB) 照射よりCOX-2発現に至る経路につき、各種阻害剤や中和抗体を用い検討を行った。

実験結果

(1) UVBによるCOX-2蛋白とmRNAの誘導

不死化したヒト表皮細胞であるHaCaT細胞にUVB30mJ/cm²を照射したところ、COX-2蛋白は約6時間後より上昇が見られ36時間後にピークに達した。COX-2 mRNAは約3時間後より上昇がみられた。

(2) UVBによるプロスタグランジンE₂ (PGE₂) 産生

HaCaT細胞にUVB30mJ/cm²を照射し、その上清中PGE₂濃度をELISA法で測定した。結果、COX-2蛋白と同様にPGE₂も約6時間後より上昇が見られた。

(3) UVBによるCOX-2蛋白発現における活性酸素の役割

HaCaT細胞を2.5又は5.0μMのH₂O₂で処理したところ、12時間後～24時間後にかけてCOX-2蛋白の発現が見られた。また、HaCaT細胞を抗酸化剤であるNACで前処理したところ、UVB照射後のCOX-2蛋白発現は部分的に抑制された。

(4) UVBによるCOX-2蛋白発現におけるEGF経路の関与

HaCaT細胞においては、UVB30mJ/cm²照射によりEGFRのリン酸化が引き起こされている。HaCaT細胞をEGFR阻害剤 (AG1478) やEGFR中和抗体で前処理したところ、UVB30mJ/cm²照射後のCOX-2蛋白発現は濃度依存的に抑制された。ただし、TGF-α中和抗体での前処理や、低温下での照射では抑制されなかった。また、HER2/erbB-2阻害剤 (AG825) の前処理では、UVB30mJ/cm²照射後のCOX-2蛋白発現は濃度依存的に上昇していた。

(5) UVBによるCOX-2蛋白発現におけるERK、p38、PI3-kinaseの関与

HaCaT細胞をMEK阻害剤 (PD98059)、p38阻害剤 (SB202190)、PI3-kinase阻害剤 (wortmannin) で前処理したところ、UVB30mJ/cm²照射後のCOX-2蛋白発現は濃度依存的に抑制された。

(6) EGFRの阻害による恒常的に発現しているCOX-2蛋白の抑制

表皮の悪性腫瘍である有棘細胞癌由来のHSC-1細胞は、恒常的にCOX-2蛋白を発現している。このHSC-1細胞をEGFR阻害剤 (AG1478) で処理したところ、COX-2蛋白発現は抑制されるとともに細胞増殖も阻害された。

考察

太陽光線などのUV照射により細胞内で活性酸素が生じ、その結果細胞に対しDNA損傷等の酸化的ストレスが生じるとされている。また、活性酸素はアポトーシスの誘導や、NF-κB、EGFRの活性化等の細胞内情報伝達にも関与しているとの報告もある。今回、我々はUVBによるCOX-2誘導において、その誘導に活性酸素が関与していること、またEGFRを介した情報伝達が重要な役割をしていることを新しく報告し、更にはERK、p38、PI3-kinaseなどのkinaseも関連があ

ることを示した。

UV照射により生じた活性酸素が、リガンドに関係なくEGFR経路を活性化する機序としては、(1) 活性酸素による脱リン酸化酵素の阻害により、EGFRのリン酸化状態が保持される。(2) 活性酸素によりEGFRの重合化が促進される。の2点が考えられている。ただ、後者のレセプターの重合化促進は、低温下でUV照射した場合は抑制されることが知られている。今回の実験では、4°CでUVBを30mJ/cm²照射した場合、JNKのリン酸化は実際に抑制されていたが、COX-2蛋白の発現は抑制されず、UVB照射後のCOX-2蛋白発現には前者の機序がより重要であると考えられた。

UV照射された培養表皮細胞のメディアムを培養線維芽細胞に移すことにより、COX-2蛋白の発現が誘導される、という報告もある。よって、UVB照射後のCOX-2蛋白発現には、UVBにより産生され放出されたTGF- α などのリガンドによるautocrine的な機序も関与していると予想される。ただし、今回の実験ではTGF- α 中和抗体の前処置ではUVB照射後のCOX-2蛋白発現は抑制されず、TGF- α 以外の他のリガンドの関与を今後検討したいと考える。

EGFR familyはEGFR/erbB-1、HER2/erbB-2、HER3/erbB-3及びHER4/erbB-4の4種類よりなるが、有棘細胞癌ではHER2/erbB-2が高発現していることが知られている。よって、UVB照射後のCOX-2蛋白発現に関するHER2/erbB-2の関与も検討しようとHER2/erbB-2阻害剤 (AG825) を用いたところ、UVB照射後のCOX-2蛋白発現は逆に促進された。この結果は、AG825自体が持つEGFRの活性化作用に起因すると思われる。

ERK、p38、Aktなどは、EGFにより活性化されることが知られている。今回の実験ではこれらのキナーゼの阻害剤により、UVB照射後のCOX-2蛋白発現は抑制されこれらのキナーゼの関与も示唆された。

また、COX-2のアンチセンスやCOX-2阻害剤により悪性腫瘍由来細胞の増殖が抑制されとの報告がある。我々の実験でも、恒常的にCOX-2蛋白を発現し

ているHSC-1細胞をEGFR阻害剤 (AG1478) で処理したところ、COX-2蛋白発現は抑制されるとともに細胞増殖も阻害された。無論、EGFRはCOX-2だけでなく他の様々な情報伝達に関与しており、この増殖抑制効果がCOX-2蛋白発現抑制やPGE₂産生低下だけに起因するものではないが、皮膚腫瘍においてもEGFRやCOX-2の阻害により腫瘍の増殖がコントロールできうことが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1499 号	氏 名	芦 田 雅 士
論文題目	Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB HaCaT 細胞では紫外線照射後のシクロオキシゲナーゼ-2 誘導に EGF 受容体が関与する		
審査委員	主 査 市 橋 正 光 副 査 杉 村 和 朗 副 査 前 田 誠 也		
審査終了日	平成 15 年 2 月 26 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

はじめに

プロスタグランディン (PG) は、膜リン脂質より遊離したアラキドン酸が、シクロオキシゲナーゼ (COX) により変換され産生される。PG の生理的作用は、細胞増殖、免疫抑制、血管増生及びアポトーシス抑制など癌の発生、増殖及び転移を促進する作用があり、PG と COX は発癌において重要な要素である。

COX には COX-1 と-2 がある。COX-1 は多くの細胞に恒常的に発現している。COX-2 は様々な刺激により発現が誘導され、各種癌においてその重要性が報告されている。皮膚癌においても、紫外線 (UV) によりヒトやマウスの表皮細胞で COX-2 が発現することや、COX-2 阻害剤によりマウスの紫外線発癌の抑制が報告されている。今回、我々は紫外線 B 波 (UVB) 照射による COX-2 発現経路を角化細胞を用いて検討した。

実験結果

(1) UVB による COX-2 の mRNA と蛋白の誘導、PGE₂ の上昇

不死化ヒト表皮細胞 (HaCaT 細胞) に UVB30mJ/cm² を照射すると、mRNA は3時間、COX-2 蛋白は6時間、上清中 PGE₂ も6時間後より上昇が見られた。

(2) UVB による COX-2 蛋白発現における活性酸素の役割

表皮細胞では H₂O₂ 処理により、12 時間後、COX-2 蛋白の発現が見られた。抗酸化剤前処理により、UVB 照射後の COX-2 発現は抑制された。

(3) UVB による COX-2 蛋白発現における EGF 経路の関与

HaCaT 細胞においては、UVB30mJ/cm² 照射により EGFR のリン酸化が引き起こる。細胞を EGFR 阻害剤や EGFR 中和抗体で前処理したところ、照射後の COX-2 蛋白の発現は抑制されたが、TGF- α 中和抗体や、低温下照射では抑制されなかった。

(4) UVB による COX-2 蛋白発現における ERK、p38、PI3-kinase の関与

MEK、p38、PI3-kinase 阻害剤で前処理したところ、照射後の COX-2 発現は抑制された。

(5) EGFR の阻害による COX-2 蛋白恒常的発現の抑制

表皮の悪性腫瘍である有棘細胞癌由来 HSC-1 細胞は、恒常的に COX-2 を発現して

いた。この細胞を EGFR 阻害剤で処理すると、COX-2 発現は抑制され、細胞増殖も阻害された。

考察

太陽光線に含まれる UV により直接、または UV により発生する活性酸素により、間接的に細胞には DNA 損傷が惹起され、ストレス応答が開始される。また、活性酸素はアポトーシス誘導や、EGFR 活性化等の細胞内情報伝達にも関与していることが明らかにされている。今回、我々は表皮角化細胞では UVB による COX-2 誘導に活性酸素が関与していること、また EGFR を介した情報伝達が重要な役割を果たしていること、更にはその活性化経路に ERK、p38、PI3-kinase が関与していることを示し、UV ストレスにおける活性酸素とシグナル伝達系の役割を強く示唆する結果を得た。

本研究は、紫外線による紅斑反応に関わる COX-2 の mRNA と蛋白質発現および PG 産生が EGFR を介していることを示し、更にはその活性化には活性酸素が関与することを、またそのシグナル伝達には ERK と p38 が関与していることを示した研究であるが、従来ほとんど行われていなかった UV による COX-2 発現の活性化経路について、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。