

ヒト顎下腺由来腺癌細胞株における 上皮成長因子 (EGF) の増殖機構の解析

澤野 桂子

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座

(主任：太田 稔 教授)

(受付：1995年6月14日)

(受理：1995年7月14日)

Abstract : The effect of epidermal growth factor (EGF) on cell proliferation was studied in HSG-AZA3, a subclone of human salivary gland adenocarcinoma cell line (HSG). The treatment with EGF, which is involved in cell growth, increased cell numbers and [³H]thymidine incorporation into DNA. In addition, stimulation of EGF enhanced both EGF receptor protein and EGF receptor mRNA levels. On the other hand, the treatment of HSG-AZA3 cells with EGF resulted in EGF-dependent tyrosine phosphorylation of EGF receptor, autophosphorylation, 5 min after stimulation, followed by activation of MAP kinase which is one of the kinases involved in the phosphorylation cascade. These findings indicate that MAP kinase received the signal from the membrane-bound EGF receptor. Moreover, the protooncogene product Fos, which acts as a transcription factor in the nuclei, was rapidly induced by EGF 1 - 3 hr after stimulation. These results suggest that activation of EGF receptor-associated tyrosine kinase and MAP kinase may play an important role in the EGF signaling pathway, and that rapid induction of Fos be prerequisite for cellular proliferation of HSG-AZA3 cells.

Key words : human salivary gland cell line, epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, MAP kinase, *c-fos*

緒 言

細胞は外からの刺激により細胞周期に入るか、増殖を停止するか、分化にいたるかを決定する機構を持つ。この制御の異常により引き起こされるものとして細胞のガン化がある。細胞増殖因子は正常細胞のみならずガン細胞においても増殖シグナルとガン化シグナルの両方を伝達することで細胞増殖の調節に関与している¹⁾が、増殖とガン化シグナルの機構の相違はいまだ不明の点が多い。細胞性ガン遺伝子のあるも

のは情報伝達系を調節する重要なタンパク質、例えば細胞増殖因子やそのレセプターあるいは核内転写調節因子などをコードする²⁻⁵⁾。このことは細胞増殖因子、そのレセプター、そして細胞性ガン遺伝子産物が細胞情報伝達機構に深く関わりをもつことを示す。

一般にヒト唾液腺ガン組織は導管上皮細胞、筋上皮細胞、および腺房細胞から構成される特徴的な上皮細胞である。細胞発生源の点から、上皮細胞は多分化能を持つ介在部導管細胞に由来する⁶⁾。また、ヒト唾液腺腫瘍細胞の形態

Growth signaling by epidermal growth factor in the human salivary gland adenocarcinoma cell line.

Keiko SAWANO

(Department of Biochemistry, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

学的研究や免疫組織化学的研究から、唾液腺介在部導管上皮細胞は分化誘導剤などの処理により筋上皮細胞や腺房細胞に分化する^{7,8)}。

白砂, 佐藤ら⁹⁾により樹立されたヒト顎下腺由来細胞株 (HSG: human salivary gland adenocarcinoma cell line) はヌードマウス移植腫瘍の組織学的検索からヒト唾液腺介在部導管上皮細胞にきわめて類似している細胞である。この HSG 細胞は分化誘導剤である 5-azacitidine 処理により 2 種類の細胞 (HSG-AZA1 ならびに HSG-AZA3) に分化する¹⁰⁾。HSG-AZA1 は筋上皮細胞に特異的なミオシンを発現, 一方 HSG-AZA3 は腺房細胞に特異的なアミラーゼを発現している。我々はこれまでに親株 HSG 細胞は分子量 46 kDa の上皮成長因子 (EGF) 様増殖因子を合成分泌し, これが自己の細胞を増殖させる「オートクリン増殖」を行うことを報告した¹¹⁾。HSG 細胞は EGF レセプターを発現しており, この EGF 様増殖因子によりこの EGF レセプター自身のリン酸化が起こることから EGF 様増殖因子は EGF レセプターを介してシグナル伝達を行いオートクリン増殖すると考えられた¹²⁾。また, このオートクリン増殖はグルココルチコイドやレチノイン酸などホルモンの影響を受けて制御されていることが明らかになった¹³⁾。

細胞増殖因子やホルモンによる情報伝達系では, 種々のプロテインキナーゼにより機能タンパク質をリン酸化するが, その際, 機能タンパク質分子の特定部位に存在するチロシン, スレオニンやセリン残基がリン酸化することによって, 機能が制御されている^{14,15)}。EGF の場合, 細胞膜上にそのレセプターを持ち, EGF 刺激, すなわち EGF が EGF レセプターに結合することにより EGF レセプター内在性チロシンキナーゼが活性化され, ついで EGF レセプター自身のチロシン残基のリン酸化, 自己リン酸化, が起こる^{16,17)}。それにより細胞内の基質タンパク質のチロシン残基のリン酸化が誘導される。その結果, 細胞内のいくつかのシグナルが活性化され, EGF の持つ増殖調節経路に変化

を与える。

レセプターシグナル変換後の細胞内でのシグナル伝達経路は多くの増殖因子で共通であると推測されてはいるものの, 細胞により標的となりうるタンパク質の発現状態やその発現レベルが異なるために, どの標的タンパク質をリン酸化して伝達経路が進むのか細胞の種類によっても異なることも考えられ, 未だ明確にされていない。

本論文では HSG 親細胞の派生細胞である HSG-AZA3 細胞を用いて EGF のシグナル伝達機構を明らかにするために EGF レセプター内在性チロシンキナーゼ, mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化そして増殖刺激に共役するといわれる核内転写因子である *c-fos* タンパク質 (Fos) の発現への影響を調べ細胞増殖機構について検討した。

材料および方法

1. 試薬

[methyl-³H] thymidine (70 Ci/mmol) は ICN Biomedicals, USA より, また EGF は Collaborative Research, USA より購入した。

抗ヒト EGF レセプター抗体は Cambridge Research Biochemicals, UK, 抗ホスホチロシン抗体は和光純薬, 抗 MAPK 抗体は Upstate Biotechnology, USA そして抗 Fos 抗体は Oncogene Science, USA よりそれぞれ購入した。

ACSII シンチレーターは Amersham, UK より購入した。その他の試薬は特級試薬を使用した。

2. 細胞および培養法

ヒト唾液腺由来造腫瘍性介在部導管上皮細胞株である HSG 細胞は口腔底粘膜に発生した扁平上皮癌の治療のために放射線照射を受けた後, 根治手術が施行された患者の顎下腺で, 病理組織学的にはガン細胞の侵襲を全く認めない唾液腺組織の培養から樹立された cell line である^{9,18)}。佐藤ら¹⁰⁾は HSG 細胞を 5-azacitidine 処理し HSG-AZA3 細胞クローンを樹立したが, この細胞は病理組織学的には腺房細胞ガン

とみなされている。本研究で用いた HSG-AZA 3 細胞は徳島大学歯学部佐藤光信教授より供与された。

HSG-AZA 3 細胞維持のために Eagle's minimum essential medium (MEM) (日水製薬) に L-glutamine 300 mg/L, カナマイシン 100 mg/L およびウシ胎児血清 (Gibco BRL, USA) を 10% 添加した培養液を用いた。通常の細胞継代は 100 mm ディッシュ (Nunc, Denmark) に 2×10^6 個の細胞を植え込み、5%CO₂, 37°C で培養した。細胞培養後 3 日目に培養液を交換し、5 日目にコンフルエントになった細胞を EDTA (0.02%) とトリプシン (2000 単位/ml, 持田製薬) を含む PBS (-) 溶液により 37°C で 5 分間処理して細胞を回収した。細胞は基本的には 5 日ごとに継代を行った。なお、細胞数は血球計算板にて算出した。

3. 細胞の増殖と形態観察

細胞数の算出のために 12 ウェルディッシュ (スミロン) の各ウェルに 1×10^5 個の細胞を植え込み、培養した。培養後、24 時間ごとにトリプシン-EDTA 処理によりウェル中の細胞を回収し、1 ウェル当たりの細胞数を算出した。なお、培養液の交換は 2 日ごとに行なった。

EGF の増殖に対する効果を調べるために細胞数を算出するとともに DNA への [³H]-thymidine の取り込み実験を実施した。24 ウェルディッシュ (Nunc, Denmark) の各ウェルに 0.5×10^5 個の細胞を植え込み培養した。培養 32 時間後に培養液を交換し同時に EGF を添加した。処理 64 時間後に 1 ウェル当たり [³H]thymidine 2 μCi を含む培養液に交換し 5%CO₂ インキュベーターでさらに 4 時間インキュベートした。細胞は冷 PBS (-) で 2 回洗浄後、1N NaOH で 37°C 20 分間可溶化した。ついで可溶化物を 4N HCl で中和、最終濃度 10% になるように 100% TCA (trichloroacetic acid) を加えた。0°C で 30 分間放置後に遠心し、上清を除去した。沈殿物は 10% TCA にて 3 回洗浄後、0.1 N NaOH を加えて可溶化した。これをバイアル瓶に移し、ACSII シンチレータを

加え、放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloka, LSC-903) により測定した。

細胞の形態を調べるために 65 mm ディッシュ (Nunc, Denmark) に 0.58×10^6 個の細胞を植え込み、培養した。培養 32 時間後に新しい培養液と交換し、ついで培養液に EGF (10 ng/ml) を添加し、64 時間後に光学顕微鏡を用いて細胞の形態学的変化を観察し、写真撮影を行った。

4. ポリアクリルアミド電気泳動 (sodium dodecyl sulfate: SDS-PAGE) ならびにウエスタンブロッティング

EGF レセプター、チロシンリン酸化タンパク質、MAPK ならびに Fos を検出するために、細胞抽出物について Laemmli 法¹⁹⁾ による電気泳動を行った。EGF 処理を行った細胞に SDS-サンプルバッファー (0.3 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 2% mercaptoethanol, 30% glycerol, 0.02% bromophenol blue: BPB) を加えて回収後、5 分間 100°C で加熱し、これを泳動用試料とした。ゲル (8%ゲル: EGF レセプター、チロシンリン酸化タンパク質、Fos; 12%ゲル: MAPK) に試料を一定量添加後、20 mA の定電流で BPB がゲルの下端に達するまで泳動を行った。なお、試料と同時に分子量マーカー (Rainbow™ protein molecular weight markers: Amersham, UK) を泳動した。泳動終了後、ゲル上で分離されたタンパク質の PVDF 膜 (ポリビニリデンフルオリド膜, ミリポア) への転写は、転写緩衝液として 10% メタノールを含むグリシン緩衝液 (pH 8) を使用し、セミドライ型装置 (アトー) により行った。転写後の膜を 5% ミルクを含む TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM NaCl, 0.05% Tween 20) 中にて室温で 3 時間、ブロッキングを行った。ついで膜を TBS-T で 5 分間 4 回洗浄後、EGF レセプター抗体、リン酸化チロシン抗体、MAPK 抗体や Fos 抗体とそれぞれ 4°C で一夜反応させた。その後、TBS-T で膜を 5 分 4 回洗浄後にストレプトアビジン-ビオチン化二次抗体で 20 分間反応させ、前回と同様洗浄操作を行った後、アルカリフォスファターゼ標

識抗ストレプトアビジン抗体と20分間反応させた。最後にアルカリフォスファターゼをBCIP/NBT (Gibco, BRL, USA) を用いて発色させてそれぞれのタンパク質を検出した。

5. RNA の調製

HSG-AZA3細胞を 2.67×10^5 個の濃度で6ウェルディッシュ (Nunc, Denmark) の各ウェルに植え込んで培養した。培養32時間後に培養液を交換し、EGF (10 ng/ml) を添加した。処理0, 3, 6, 12, 24, 48, 64時間後に回収した細胞よりRNAを以下のごとく抽出した²⁰⁾。すなわち、培養液を除去した培養細胞に直接チオシアン酸グアニジン溶液 (4 M グアニジンチオシアネート, 25 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0), 0.5% N-ラウロイルサルコシナトリウム, 0.1 M 2-メルカプトエタノールを含む) を添加後、細胞を2 ml エッペンドルフチューブに採取した。この細胞懸濁液を激しく攪拌し、ついで2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0), フェノール, クロロホルム/イソアミルアルコール (49/1 容量比) を順次加えて混合し、15分間氷冷した。10,000 × g, 20分間遠心後、水層を新しいチューブに移しイソプロパノールを加えて-20°Cで1時間冷却した。遠心により得たRNAペレットに再度グアニジンチオシアネート溶液を加えて溶解した。溶解液にイソプロパノールを加えて-20°Cで1時間放置後、遠心した。得られた沈殿RNAを80%エタノールで洗浄、乾燥させた後に滅菌水に溶解した。なおRNA量は260 nmの吸光度から $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$ で計算した。

6. RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法

細胞より抽出したRNAからcDNAを合成し、ついでEGFレセプターの増幅を行うためにGeneAmp[®] Thermostable rTth Reverse Transcriptase RNA PCRキット (タカラ) を用いた。なお、rTth reverse transcriptaseはreverse transcriptase活性とDNA polymerase活性の両方を有しているので1つの酵素でRNAからcDNA合成およびcDNA増幅を行

うことができる。EGFレセプターのセンスプライマーとして5'-AGAACAACACCCTGGTCTGGAAGT-3'を、またアンチセンスプライマーとして3'-TTCTAGGGCAGGTAGCGTGACC-5'を作成した。

はじめに総RNAからcDNAを合成するためにrTth reverse transcriptaseを含むRT反応液4 μlを70°C 10分間加熱後、直ちに水中で急冷し反応を停止させた。生成されたcDNA溶液にPCR反応液16 μlを加えて、アニーリング55°C 60分、伸長72°C 1分、変性94°C 1分を25サイクル繰り返してcDNAの増幅を行った。予想される142 bpを持つEGFレセプター増幅産物について、エチジウムブロマイド存在下で2%アガロースゲル電気泳動を行った後に、紫外線照射により検出した。

試料とともに100bp DNA ladder (Gibco BRL, USA) を泳動し、EGFレセプター増幅産物のDNAサイズを確認した。

結 果

1. 細胞増殖に及ぼすEGFの効果

HSG-AZA3細胞を12ウェルディッシュの各ウェルに 1×10^5 個を植え込み、8日間培養した。培養2日目から直線的に細胞の増殖が認められ、6, 7日目で定常状態になり8日目で細胞数が減少した (データは示さない)。また、倍加時間は43時間であった。これら基礎的データに基づき本実験における細胞培養やEGF処理の条件を決定した。特に記載しない場合には細胞が対数増殖期にある培養32時間後にEGF処理を行い、64時間後 (培養4日目) に実験に供した。

細胞増殖因子の一つであるEGFは一般に多数の上皮系細胞に対して強い細胞増殖亢進作用をもつことが知られている。そこで、HSG-AZA3細胞の増殖に及ぼすEGFの影響を調べた。HSG-AZA3細胞を12ウェルディッシュの各ウェルに 1×10^5 個の濃度で植え込み、培養32時間後にEGF (10 ng/ml) を添加し、6日間培養を継続した結果、Fig.1に示す

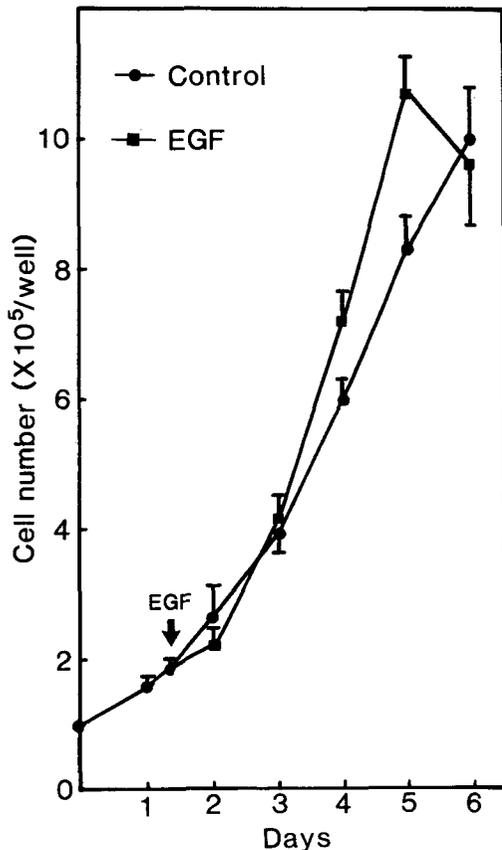


Fig.1. Effect of EGF on growth of HSG-AZA3 cells in culture.

Cells were plated into 12 well-plate at a density of 1×10^6 cells/well and incubated at 37°C in a 5% CO_2 incubator. The medium change was performed on the 3rd and 5th days after plating. The arrow indicated the position of the EGF addition.

ような細胞増殖曲線が得られた。培養3日目迄は対照群とEGF処理群の細胞数には差異は認められないが、EGF 64時間処理(培養4日目)群は対照群に比較し、1.2倍の増殖を、またEGF処理88時間(培養5日目)では1.3倍の増殖を示した。培養6日目では、EGF処理群の細胞数は5日目のそれより減少し、対照群と同値であった。この際、EGFによる細胞の増殖が停止し、細胞の死が認められた。

つぎに、 ^3H thymidineの取り込みを指標に

Table 1. Effect of EGF on DNA synthesis.

Additions	Incorporation of ^3H thymidine (dpm/well)
None	$18,091 \pm 677$
EGF (1 ng/ml)	$26,503 \pm 1,781$
EGF (5 ng/ml)	$48,534 \pm 3,745$
EGF (10 ng/ml)	$54,804 \pm 3,894$

HSG-AZA3 cells were plated into 24 well-plate at a density of 5.3×10^4 cells/well. Cells were cultured for 64 hr in the absence or presence of EGF and then the cells were incubated with ^3H thymidine. The radioactivity incorporated into acid-insoluble materials was counted. The values are the average \pm S. D. of 6 wells.

してHSG-AZA3細胞のDNA合成に及ぼすEGFの効果を調べた。すなわち、細胞培養32時間後に3種類の濃度のEGF(1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml)を添加し、その64時間後(培養4日目)に ^3H thymidineとインキュベートしてDNAに取り込まれた放射活性を測定した。EGF処理では対照群に比べ濃度依存的に ^3H thymidineの取り込みの増加が見られた(Table 1)。また、EGFを10 ng/ml濃度で添加した際には未添加群に比較し、およそ3倍の取り込みの増加を認めた。これらの結果はHSG-AZA3細胞が添加EGFに反応性を持ち、細胞増殖を亢進させること、また、この細胞増殖亢進は生理的濃度のEGFで誘導されることから、このEGF効果はEGFレセプターを介することが示唆された。

2. HSG-AZA3細胞の形態に及ぼすEGFの効果

HSG-AZA3細胞は細胞質に多数の分泌顆粒が存在し、多角形の敷石状の上皮性形態を示す(Fig.2-A)。EGFを添加すると、Fig.2-Bに示すように細長い突起の形成が認められたが、分泌顆粒は不変であった。この形態変化はHSG親細胞をEGFで処理した際に認められる典型的な変化と同様であった。

3. EGFレセプターに及ぼすEGFの効果

EGFはその効果を現す際には細胞膜表面に存在する分子量約170,000(170 kDa)のEGF

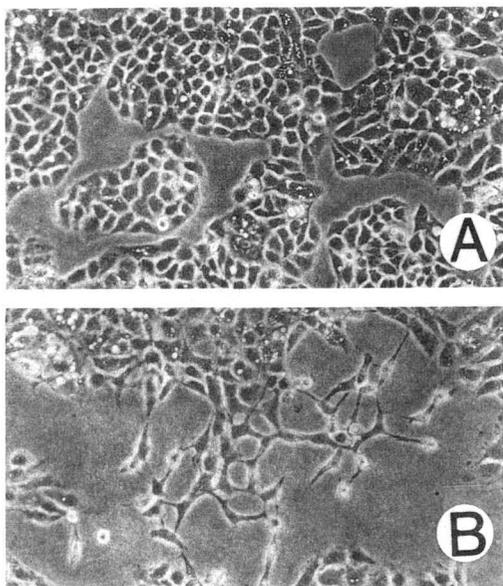


Fig.2. Effect of EGF on the morphological features.

HSG-AZA3 cells were plated into 60 mm Petri dish at a density of 5.8×10^5 cells and cultured for 64 hr in the absence (A) or presence (B) of EGF (10 ng/ml).

Photographs were taken under microscopy on the 4th day after plating. $\times 570$

レセプターを介することが知られている。そこで、HSG-AZA3細胞におけるEGFレセプターの存在を抗ヒトEGFレセプター抗体を用いたウェスタンブロッティング法により調べた。未処理の細胞についてその細胞可溶化物のSDS-PAGEを行い、分離したタンパク質を膜にトランスファーし、抗ヒトEGFレセプター抗体と結合後アビジン-ビオチン複合体法によって検出した。その結果、Fig.3に示すように約170 kDa付近にEGFレセプタータンパクのバンドを見出した。したがって、この細胞はEGFレセプターを発現していることが確認された。また、EGF処理64時間後の細胞についても同様の実験を行ったところ、未処理群に比べ濃いバンドが170 kDaの位置に検出されたが、これはEGF刺激によりEGFレセプターが増加することを示している。

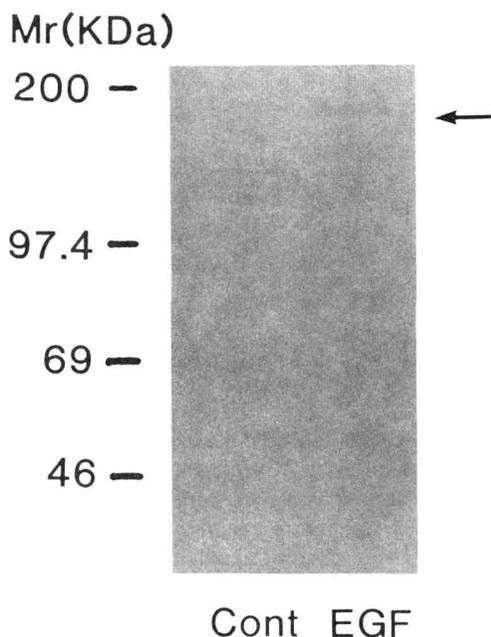


Fig.3. Effect of EGF on EGF receptor level in HSG-AZA3 cells.

HSG-AZA3 cells were plated into 60 mm Petri dish at a density of 5.8×10^5 cells and cultured for 64 hr in the absence or presence of EGF (10ng/ml). Total cellular extract was subjected to SDS-PAGE gel, transferred and immunoblotted as described in "Materials and Methods." The right arrow indicated the position of the specific band of EGF receptor. The positions of the molecular weight markers were indicated on the left.

4. RT-PCR法によるEGFレセプターmRNAの検索

HSG-AZA3細胞にEGFレセプターの発現が認められ、EGF処理後にEGFレセプタータンパク量の増加が認められたことから、EGFレセプターをmRNAレベルで検索した。EGFレセプターに特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行ったところEGF未処理群 (Fig.4)において142 bpの部位に増幅されたPCR産物のバンドを認めた。したがって、HSG-AZA3細胞においてEGFレセプター

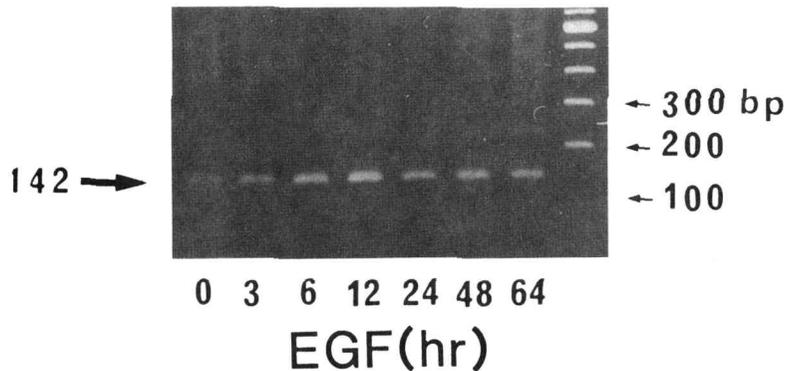


Fig. 4. Analysis of EGF receptor mRNA by RT-PCR in HSG-AZA3 cells.

Amplified PCR products were obtained using EGF receptor-specific primers and cDNA template reverse-transcribed from total RNA of HSG-AZA3 cells. The RT-PCR products were visualized on a 2 % agarose gel by ethidium bromide staining. The left arrow indicated the position of the specific band of amplified EGF receptor product. The right arrows indicated the position of the 100bp DNA Ladder.

mRNAが発現していることが明らかとなった。また、この増幅バンドはEGF処理12時間後に増強し、48時間から64時間で増幅の減少を認めた。これらの結果からEGFはEGFレセプター mRNAを増加させることによりレセプタータンパクの合成を促進することが推測された。

5. EGFによるEGFレセプター内在性チロシンキナーゼ活性刺激効果

EGFは細胞表面に存在するEGFレセプターに結合することにより、レセプター自身のもつチロシンキナーゼが活性化され、リン酸化シグナルが駆動する。また、これにともないレセプターの細胞内領域のチロシン残基も自己リン酸化される^{16,17)}。したがって、EGFレセプターの自己リン酸化はEGFによるシグナル伝達の指標ともなる。そこで、EGF刺激後にEGFレセプターが持つチロシン残基がリン酸化されるかどうかを調べるために、チロシンリン酸化に特異的な抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、EGF投与直後、すなわち0分時、ではEGFレセプタータンパク質が存在する170 kDaの部位にリン酸化チロシン抗

体と反応するバンドは認められなかったが、EGF処理5分後に170 kDaの位置にチロシンリン酸化バンドが出現した (Fig.5, 矢印)。このリン酸化されたバンドは60分後においても観察されたが、EGF処理180分後には消失した。したがって、EGFレセプターはEGF処理後に速やかにチロシン残基がリン酸化を受け、時間とともにリン酸化が消失すると推測される。また、170 kDaの位置のチロシンリン酸化の他にMAPKやMAPKキナーゼ (MAPKK)に相応する部位 (およそ42-44 kDa; Fig.5, 下部アローヘッド)、あるいはRafに相応する部位 (およそ74 kDa; Fig.5, 上部アローヘッド) にチロシンリン酸化バンドを認めた。この結果からだけではこれらのリン酸化バンドがRafかMAPK/MAPKKであるかどうかは確実ではないが、EGF処理によりEGFレセプターの内在性チロシンキナーゼが活性化され、細胞内基質タンパクのチロシンリン酸化を引き起こし、シグナルが伝達されている可能性が示唆された。

7. EGFによるMAPK活性促進効果

EGFがEGFレセプターに結合すると内在性

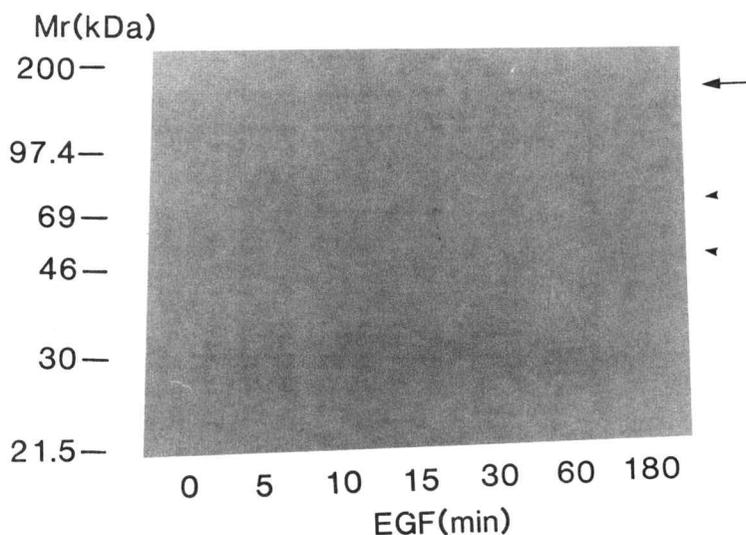


Fig. 5. Tyrosine phosphorylation of EGF receptor in HSG-AZA3 cells. Cells were plated into 60 mm Petri dish at a density of 5.8×10^5 cells and cultured for 3 days. On the 4th day after plating, medium was changed to serum-free one. After cultivation for 1hr, cells were stimulated with EGF (10 ng/ml) for 0, 5, 10, 15, 30, 60 or 180 min. Whole cell extracts were subjected to SDS-PAGE gel and analyzed by Westernblotting with anti-phosphotyrosine antibody. The molecular masses of the protein standards were indicated on the left. The arrow indicated the migration of EGF receptor.

チロシンキナーゼが活性化される。さらに、この活性化チロシンキナーゼが細胞内の機能性タンパク質をリン酸化する²¹⁻²³。リン酸化される機能性タンパク質には Shc, Ash/Grb2, Ras などがあるが、そのひとつである MAPK が活性化されるかについてウェスタンブロットングにより検索した。MAPK は情報伝達系において、そのひとつ上流に存在する MAPKK によってチロシン、スレオニンのリン酸化を受けて活性化されるが、リン酸化された MAPK は SDS-PAGE 上での移動度が非活性化型キナーゼよりも遅くなることで確認できる。非活性化型 MAPK は 42 と 44 kDa の位置にバンドが存在し、MAPK が活性化されると 42 → 43, 44 → 45 kDa へとシフトする。本実験においては未処理群で 42 と 44 kDa に相応する 2 本のシングルバンドが見られ HSG-AZA 3 細胞に MAPK が発現されていることが明らかとなった (Fig. 6)。EGF 添加 10 分後にこれら 2 つの

バンドは明瞭な 4 つのバンドとして分離されてはいないが、42 kDa のバンドはダブルットとして存在した。ダブルットを示すバンドの強度は 30 分後に最大であった。これらの結果から EGF 刺激後のシグナルが EGF レセプター内在性チロシンキナーゼを介して MAPK に伝達されていることが確認された。

8. 細胞性ガン遺伝子産物 Fos タンパク質の検索

細胞性ガン遺伝子産物、Myc, Jun, Fos は細胞増殖因子の刺激により発現誘導される核内転写制御因子で、多くの細胞株において恒常的に発現することが認められている。

HSG 親細胞においては、細胞核内に Fos が発現していることを免疫組織染色法により認めている²⁴。そこで、HSG-AZA3 細胞の Fos の発現を抗 Fos 抗体を用いてウェスタンブロットングにより調べ、さらに EGF の効果を経時的に調べた。HSG-AZA3 細胞を培養 3 日目

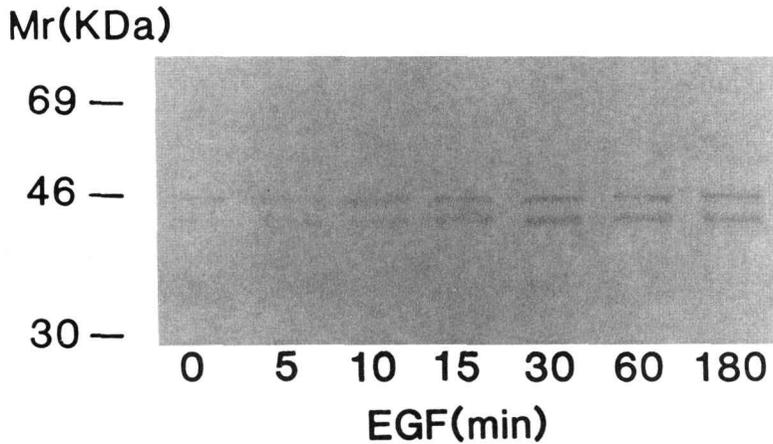


Fig. 6. Effect of EGF on MAP kinase in HSG-AZA3 cells.

Cells were plated and incubated as described in Fig. 5. Cells were treated with EGF for 0, 5, 10, 15, 30, 60 or 180 min. Whole cell extracts were subjected to SDS-PAGE gel, transferred and immunoblotted with rabbit polyclonal anti-MAP kinase antibodies.

に EGF 処理を行い 0, 0.5, 1, 3, 6, 9 時間後に SDS-サンプルバッファーにて細胞を回収し、ウェスタンブロットングに供した。その結果、約 62 kDa の位置に Fos のバンドが認められた (Fig. 7)。このバンドの強度は EGF 処理 1 時間から 3 時間で増強し、その後しだいに減弱した。また、SDS-PAGE ゲル上で移動度の遅いバンド (およそ 63 - 69 kDa の位置) が EGF 処理 1 時間から 3 時間後に認められたが、これは修飾された Fos すなわち MAPK によりリン酸化を受けた Fos であろうと推測された。

考 察

本研究で使用した HSG-AZA3 細胞は HSG 細胞を分化誘導剤である 5-azacitidine 処理によって得たクローンの 1 つで、親株の HSG 細胞と異なり唾液腺の主な分泌タンパクであるアミラーゼの発現が認められている分化型の細胞である。この HSG-AZA3 細胞を EGF で処理すると細胞数の増加と [³H] thymidine の DNA への取り込みが増加したことから EGF は細胞増殖亢進に作用し、これは EGF の細胞

増殖シグナルが EGF レセプターを介して伝達されることが示唆された。また、[³H]-thymidine の取り込みを細胞増殖の指標にした際、HSG 親株細胞では EGF (10 ng/ml) 処理後に、約 1.4 倍の取り込みの増加を²⁵⁾、一方、HSG-AZA3 細胞では約 3 倍の増加が認められた。この結果は、親株に比べ、分化型の HSG-AZA3 が EGF に対する応答性が高いことを示しており、EGF によるシグナル伝達機構を解析していく上で HSG-AZA3 細胞は有用な系と考えられる。

本研究では細胞増殖因子として EGF を用いたが、EGF は新生児マウスの眼瞼開裂および切歯出現の早期化を促進する因子として顎下腺から単離された物質²⁶⁾で、上皮細胞のみならずきわめて多種多様な組織細胞に作用する増殖因子である。EGF は形質膜を自由に透過できないので、細胞膜表面に存在する EGF レセプターに結合することによりシグナルを細胞内に伝達する。EGF レセプターは細胞膜外側のリガンド結合領域、膜貫通領域そして細胞膜内側のチロシンキナーゼ領域と C 末端領域から

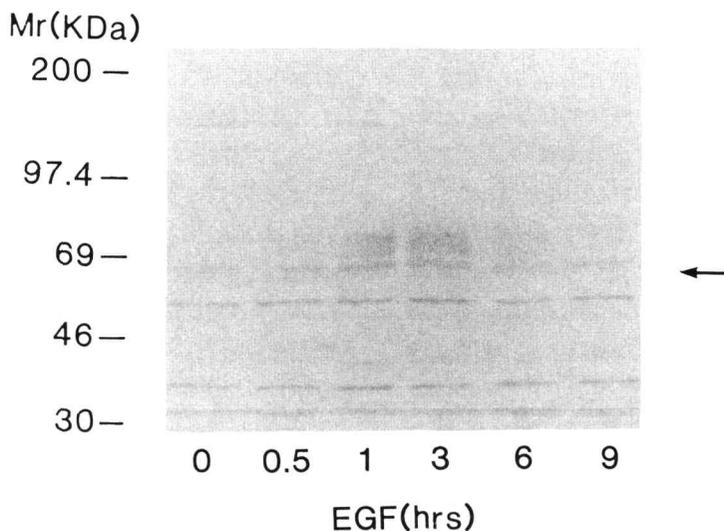


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of Fos in HSG-AZA3 cells.

Cells were plated and incubated as described in Fig. 5. Cells were treated with EGF (10 ng/ml) for 0, 0.5, 1, 3, 6, or 9 hr. Whole cell extracts were subjected to SDS-PAGE gel, transferred and immunoblotted with anti-Fos antibody. The arrow indicated the position of the specific band of Fos.

成っている分子量 170 kDa の糖タンパク質であり、これまでの研究から、これら各領域の機能の多くが明らかとなっている。

EGF による細胞増殖機構に介在すると考えられる EGF レセプターの HSG-AZA3 細胞における存在を調べるためにヒト EGF レセプターに特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティングを実施したところ、約 170 kDa の位置にバンドを検出した。また、このバンドの強度は EGF 処理により上昇した。一方、EGF レセプターに特異的なプライマーを用いた RT-PCR 解析において予想された cDNA 増幅産物が検出され、HSG-AZA3 細胞に EGF レセプターが発現することが示された。また、EGF 処理 12 時間後に EGF レセプター mRNA レベルは最大となったが、この mRNA レベルでの増加が、上述したタンパクレベルでの増加に先立つことから、EGF による EGF レセプターの増加はレセプタータンパクの合成を介していることが明らかとなった。Aladib ら²⁷⁾は HSG ならびに HSG-AZA3 細胞における EGF レセプ

ターについて細胞当たりの総レセプター数は HSG 親株細胞に比べ、HSG-AZA3 細胞でやや少ないが、EGF の細胞表面での結合時間は HSG-AZA3 細胞で長いことから、EGF の情報伝達刺激は親細胞より、HSG-AZA3 細胞で持続することを報告している。したがって、このことが親細胞 HSG と派生細胞 HSG-AZA3 において EGF に対する増殖への応答性の相違を引き起す原因の 1 つになっているのかもしれない。

細胞膜を貫通した状態で単量体として存在する EGF レセプターの細胞外領域に EGF が結合すると細胞膜上で EGF レセプターの凝集が生じ EGF-EGF レセプター複合体は二量体を形成するが、その際、EGF レセプターの細胞内領域のチロシンキナーゼが活性化される。ついで EGF レセプターの C 末端領域が自らのチロシンキナーゼ活性によりリン酸化(自己リン酸化)^{16,17)}される。この自己リン酸化部位に細胞内基質タンパクが結合し新たなシグナルを引き起こす。この変化が情報伝達開始となり細胞増

殖・形態変化・細胞分化など多岐にわたる効果をもたらす。本研究においてEGF添加時のEGFレセプター自己リン酸化を抗リン酸化チロシン特異抗体を用いて経時的に解析した結果、EGF添加0分時に検出されないバンドが添加5分後に約170 kDaの位置に出現した。この170 kDaの位置はEGFレセプターの位置に相応することからEGFレセプターがチロシンリン酸化を受けたバンドであることを推測させた。また、EGFレセプターの自己リン酸化は時間の経過とともに消失したことよりEGFによるシグナルはすみやかに開始された後、細胞内へ伝達されることが示唆された。

最近の研究からEGFによる増殖シグナル伝達系においてEGFレセプター内在性チロシンキナーゼの下流にAsh/Grb2やSosを介したrasタンパクに至るシグナル伝達経路^{22,23)}、さらに下流にはMAPキナーゼカスケードが存在することが明らかとなった²⁸⁾。MAPキナーゼカスケードは正常ならびに腫瘍組織、また培養細胞において普遍的に存在し、細胞の増殖や分化機能の調節に重要な役割を果たしている。培養細胞においてMAPKは種々の増殖因子や発癌プロモーターの刺激により共通の活性化するセリン・スレオニンキナーゼであり、40-45 kDaの触媒サブユニットだけからなる単量体の酵素である²⁹⁻³²⁾。このMAPKの活性化因子はMAPKキナーゼ(MAPKK)で、これは分子量45 kDaのセリン/スレオニン/チロシンキナーゼであり、MAPKのスレオニンとチロシンをリン酸化して活性化する³³⁾。さらに、最近ではMAPKKのさらに1つ上流にこれをリン酸化するMAPKKキナーゼ(MAPKK-K)も発見されているが、MAPKK-Kに関しては、EGF刺激後にチロシンリン酸化される分子量74-75 kDaのRafもその1つと考えられている³⁴⁻³⁶⁾。本研究においてEGFレセプターのチロシンリン酸化状態を検索した際に、EGF処理後に170 kDaのEGFレセプターのバンドに加えて約45 kDa分子ならびに約74-75 kDa分子のリン酸化バンドが出現した。分子量

の一致からだけでは判断できないが、これら分子のうち約46 kDaタンパクはMAPKかMAPKK、そして約74 kDaタンパクはRaf、である可能性も高く、今後はこれら伝達分子についての詳細な検討が必要と思われる。本研究では約45 kDaに位置するチロシンリン酸化バンドはMAPKかMAPKKに関連するタンパクである可能性が示唆されたことから、MAPK抗体を用いたウェスタンブロッティングによる検索を行った。その結果、分子量の異なる42ならびに44 kDaの2本のバンドが検出された。このMAPKは上流に存在するMAPKKによってチロシン・スレオニンのリン酸化を受けて活性化されると、リン酸化MAPK(活性型)となる。活性型MAPKはSDS-PAGE上での移動度が非活性型MAPKより遅くなるので、これを指標にして分析すると、EGF刺激10分後におよそ42 kDaの位置のバンドがダブルットで認められ、このバンドの強度は30分で上昇した。この結果からEGFのシグナルはMAPKKに伝達された後に、MAPKの活性化を引き起こしたことを示している。従って、EGF刺激によりEGFレセプター内在性チロシンキナーゼの活性化にひきつづき、細胞内のシグナル伝達経路中の標的タンパク質であるいくつかの伝達分子のチロシンリン酸化による活性化を経て、MAPキナーゼカスケードが確実に働いたものと思われた。

EGFレセプター内在性チロシンキナーゼの下流にRasがあり、Rasの活性化によりMAPキナーゼカスケードが活性化され、最終的に核内での転写の活性化というEGFの増殖シグナルの基本的な経路にかかわる伝達成分やその働きについてはまだ不明の点が多い。たとえば、MAPKKを活性化するMAPKK-Kについてガン遺伝子産物Raf-1がその候補としてあげられている³⁴⁻³⁶⁾。一方で、同じくガン原遺伝子産物MosがMAPKK-Kとして機能すると言う報告もある³⁷⁾。しかし、最近、Rasの直接の標的タンパクはRaf-1であることが明らかにされ³⁸⁾、RasからMAPKへの経路が明らかにな

りつつある。

最近、細胞質に存在する活性型 MAPK の一部が増殖刺激により核に移行することが明らかとなったが、このことは MAPK が核内において機能することを示唆している。MAPK により制御されている核内分子として Fos や Myc などの転写因子があげられる^{38,40}。一般に *c-fos* は *c-jun* や *c-myc* などと同様 immediate early gene とよばれている遺伝子で増殖因子の刺激により数分で転写が誘導される。本研究において核内転写因子として働く細胞性ガン遺伝子産物 Fos への EGF の影響を調べた結果、EGF 処理 1 時間から 3 時間後に Fos 発現の増大を認めた。また、SDS-PAGE ゲル上で移動度の遅い Fos のバンドが認められたが、活性型 MAPK が核の中で Fos のリン酸化に関与することが報告されていることから、これは Fos のリン酸化されたバンドである可能性が高い。Fos は細胞性ガン遺伝子産物 Jun とヘテロダイマーを形成し、転写活性化因子 (AP-1: activated protein-1) として標的遺伝子プロモーター領域の AP-1 responsive element に結合して種々の増殖関連遺伝子の活性化を調節することにより細胞増殖に関わっていることが明らかとなっているが、本研究の結果から、HSG-AZA3 細胞において EGF による増殖促進にも AP-1 が関与している可能性が示唆された。今後は、シグナル伝達系の最下流に位置する核内での転写制御機構の解明が重要な研究課題であり、詳細な検討が必要と考える。

結 語

ヒト顎下腺由来腺癌細胞株 (HSG 細胞) の派生細胞である HSG-AZA3 細胞における EGF のシグナル伝達機構について検討した。

1. EGF 処理により細胞数と [³H]thymidine 取り込みが増加し、細胞の増殖が亢進した。
2. ウェスタンブロッティングによる分析の結果、EGF 処理 64 時間後において EGF レセプターが増加した。
3. RT-PCR の解析の結果、EGF レセプター

mRNA の発現は EGF 処理 12 時間後に最大となり、48 時間から 64 時間で減少した。

4. EGF 添加 5 分後に EGF レセプターのチロシンリン酸化を認めた。このリン酸化は 3 時間までに減少した。
5. EGF 投与により MAPK のリン酸化が惹起され、処理 30 分で最大となり、その後徐々に減少した。
6. EGF 処理 1 時間から 3 時間後に核内に存在する Fos の発現の増加を認めた。

これらの結果から HSG-AZA3 細胞における EGF のシグナル伝達経路に EGF レセプター内在性チロシンキナーゼと MAPK が重要な役割を持つこと、また EGF による細胞増殖促進には EGF レセプターの増加や Fos 発現を介することが明らかになった。

謝 辞

ご指導とご校閲を頂いた岩手医科大学歯学部口腔生化学講座 太田 稔教授、実験に際しご助言、ご協力を頂いた佐藤詔子助教授に心より謝意を表します。また、論文をまとめるにあたり多大のご助言、ご教示を頂いた客本斉子博士に、本論文のタイプ清書にご協力頂いた細川香代子嬢に感謝いたします。

文 献

- 1) Heldin, C-H. and Westermark, B.: Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell* 37: 9-20, 1984.
- 2) Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrase, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Waterfield, M. D.: Close similarity of epidermal growth factor receptor and *v-erb-B* oncogene protein sequences. *Nature* 307: 521-527, 1984.
- 3) Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E. L. V., Whittle, N., Waterfield, M. D. and Seeburg, P. H.: Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418-425, 1984.
- 4) Ishii, S., Xu, Y-h., Stratton, R. H., Roe, B. A., Merlino, G. T. and Pastan, I.: Characterization

- and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 4920 - 4924, 1985.
- 5) Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. and Tjian, R. : Human proto-oncogene *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1 *Science* 238 : 1386 - 1392, 1987.
 - 6) Eversole, L. R. : Histogenic classification of salivary tumors. *Arch. Path.* 92 : 433 - 443, 1971.
 - 7) Hubner, G., Kleinsasser, O. and Klein, H. J. : Zur Feinstruktur und Genese der Cylindrome der Speicheldrüsen. Weitere Untersuchungen zur Rolle myoepithelial differenzierter Zellen in Speicheldrüsen-geschwulsten. *Virchows Arch. Path. Anat.* 347 : 296 - 315, 1969.
 - 8) Hoshino, M. and Yamamoto, I. : Ultrastructure of adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 25 : 186 - 198, 1970.
 - 9) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T. : A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* 48 : 745 - 752, 1981.
 - 10) Sato, M., Azuma, M., Hayashi, Y., Yoshida, H., Yanagawa, T. and Yura, Y. : 5-Azacytidine induction of stable myoepithelial and acinar cells from a human salivary intercalated duct cell clone. *Cancer Res.* 47 : 4453 - 4459, 1987.
 - 11) Kurokawa, R., Kyakumoto, S. and Ota, M. : Autocrine growth factor in defined serum-free medium of human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. *Cancer Res.* 49 : 5136 - 5142, 1989.
 - 12) Kyakumoto, S., Kurokawa, R., Hoshino, M. and Ota, M. : Coexpression of epidermal growth factor-receptor and *c-erbB-2* proto-oncogene product in human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG and the implications for HSG cell autocrine growth. *Archs. Oral Biol.* 39 : 569 - 580, 1994.
 - 13) Kurokawa, R., Kyakumoto, S. and Ota, M. : Retinoic acid receptor in subclone of human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG and effect of retinoic acid on cellular growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 1095 : 63 - 74, 1991.
 - 14) Hunter, T. and Cooper, J. A. : Protein-tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 897 - 930, 1985.
 - 15) Edelman, A. M. : Protein serine/threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 567 - 613, 1987.
 - 16) Downward, J., Parker, P. and Waterfield, M. D. : Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* 311 : 483 - 485, 1984.
 - 17) Margolis, B. L., Lax, I., Kris, R., Dombalagian, M., Honegger, A. M., Howk, R., Givol, D., Ullrich, A. and Schlessinger, J. : All autophosphorylation sites of epidermal growth factor (EGF) receptor and HER2/*neu* are located in their carboxyl-terminal tails. Identification of a novel site in EGF receptor. *J. Biol. Chem.* 264 : 10667 - 10671, 1989.
 - 18) 白砂兼光 : ヒト唾液腺癌 : HSG, 生体の科学, 43 : 393, 1992.
 - 19) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680 - 685, 1970.
 - 20) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156 - 159, 1987.
 - 21) Morrison, D. K., Kaplan, D. R., Rapp, U. and Roberts, T. M. : Signal transduction from membrane to cytoplasm : Growth factors and membrane-bound oncogene products increase Raf-1 phosphorylation and associated protein kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 8855 - 8859, 1988.
 - 22) Simon, M. A., Dodson, G. S. and Rubin, G. M. : An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21^{Ras} activation and binds to sevenless and Sos proteins *in vitro*. *Cell* 73 : 169 - 177, 1993.
 - 23) Buday, L. and Downward, J. : Epidermal growth factor regulates p21^{Ras} through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73 : 611 - 620, 1993.
 - 24) 星野正行 : ヒト顎下腺由来腺ガン細胞株の増殖と分化に及ぼすジブチリル cAMP の効果, 歯基礎誌, 35 : 505 - 519, 1993.
 - 25) Kurokawa, R., Kyakumoto, S. and Ota, M. : Glucocorticoid regulates secretion of epidermal growth factor in the human salivary gland adenocarcinoma cell line. *J. Endocr.* 116 : 451 - 455, 1988.
 - 26) Cohen, S. : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.* 237 : 1555 - 1562, 1962.
 - 27) Aladib, W., Yoshida, H. and Sato, M. : Effect of epidermal growth factor on the cellular proliferation and phenotype of a neoplastic human salivary intercalated duct cell line or its derivatives. *Cancer Res.* 50 : 7650 - 7661, 1990.
 - 28) Nishida, E. and Gotoh, Y. : The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* 18 : 128 - 131, 1993.
 - 29) Ray, L. B. and Sturgill, T. W. : Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 *in vitro*. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA* 84 : 1502 - 1506, 1987.
- 30) Hoshi, M., Nishida, E. and Sakai, H. : Activation of a Ca^{2+} -inhibitable protein kinase that phosphorylates microtubule-associated protein 2 *in vitro* by growth factors, phorbol esters, and serum in quiescent cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 263 : 5396 - 5401, 1988.
- 31) Gotoh, Y., Nishida, E., Yamashita, T., Hoshi, M., Kawakami, M. and Sakai, H. : Microtubule-associated-protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. Identity with the mitogen-activated MAP kinase of fibroblastic cells. *Eur. J. Biochem.* 193 : 661 - 669, 1990.
- 32) Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H. and Yancopoulos, G. D. : ERKs : A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65 : 663 - 675, 1991.
- 33) Matsuda, S., Kosako, H., Takenaka, K., Moriyama, K., Sasaki, H., Akiyama, T., Gotoh, Y. and Nishida, E. : *Xenopus* MAP kinase activator : identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. : *EMBO J.* 11 : 973 - 982, 1992.
- 34) Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X-f., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R. and Avruch, J. : Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358 : 417 - 422, 1992.
- 35) Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P. and Marshall, C. J. : Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71 : 335 - 342, 1992.
- 36) Dent, P., Haser, W., Haystead, T. A. J., Vincent, L. A., Roberts, T. M. and Sturgill, T. W. : Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-raf in NIH3T3 cells and *in vitro*. *Science* 257 : 1404 - 1407, 1992.
- 37) Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F. and Cooper, J. A. : Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 2546 - 2553, 1993.
- 38) Egan, S. E. and Weinberg, R. A. : The pathway to signal achievement. *Nature* 365 : 781 - 783, 1993.
- 39) Gupta, S., Seth, A. and Davis, R. J. : Transactivation of gene expression by Myc is inhibited by mutation at the phosphorylation sites Thr-58 and Ser-62. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 3216 - 3220, 1993.
- 40) Marais, R., Wynne, J. and Treisman, R. : The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73 : 381 - 393, 1993.