博士（歯　学）　山　本　栄　治

学位論文題名

Inorganic polyphosphate induces EGF-mediated cell proliferation by activating ERK phosphorylation

（ポリリン酸はERKリン酸化を活性化しEGFを介した細胞増殖に関与する）

学位論文内容の要旨

ポリリン酸は多数の正リン酸残基からなる直鎖状のポリマーで，単純な化学構造をしており，世界中で過去 50 年以上食品添加物として使用され，人体にとっての安全性が確立された材料である．ポリリン酸はあらゆる原核生物や真核生物，さらには昆虫，高等植物や哺乳類の細胞内および組織内に普遍的に存在し，原核生物ではポリリン酸がエネルギー供与体やリン酸リザーバーとしての機能を持つこと，陽イオンと結合しキレート剤の機能をもつこと，糖やアデニル酸キナーゼのドナーとなることなどがこれまで報告されている．しかし，真核細胞では，柴らの，線維芽細胞においてFGF - 2を安定化し組織再生において重要な役割を演じているという報告，川添らのマウス骨芽細胞株MC3T3E-1 細胞においてosteopontin，osteocalcinを発現亢進し石灰化を促進するという報告や，小野寺らのヒト歯根膜線維芽細胞でRhoファミリーRac1のリン酸化亢進を促し細胞運動を活性化させることなどの報告があるのみで，ポリリン酸の真核細胞における生理的役割についてはほとんど明らかにされていない．本研究は、EGF/EGF レセプターによる細胞増殖にポリリン酸がどのような役割を果たすのかについて，とくに細胞内シグナル伝達経路の 1 つであるMAPキナーゼの発現，リン酸化について検索を行った．

実験にはヒト扁平上皮癌細胞A-431とヒト肺がん細胞A-549を用い，細胞は非働化10% FBS添加DMEMを用いて37℃，5%CO_2条件下にて維持した．実験に用いたポリリン酸は平均鎖長 65 のポリリン酸ナトリウムを純水に溶解し1Nの水酸化ナトリウムでpH7.4になるように調整後に0.45μmのフィルターで濾過滅菌を行ったものを用いた．細胞の増殖をMTS assayで検索した．細胞が70～80% confluent時にトリプシン処理し，10%FBSを含むDMEM中に細胞数が2000個の割合で96-well plateに播種し，24時間後に細胞が定着したのを確認後，ポリリン酸を含む0.5%FBS添加DMEMに交換し48時間培養後，通法に従い吸光度を測定し細胞増殖活性を検討した．また，細胞接着後，無血清培地で12時間serum starvationを行ったのちに，ポリリン酸およびEGFを

含む試験培地に交換し 24 時間培養後，同様に吸光度を測定し，ポリリン酸が EGF 刺激にどのような細胞増殖活性を及ぼすかについて検討した．培養細胞の MAP キナーゼの発現を Western blot で検索した．細胞を 70～80%conflent 時に無血清培地で 12 時間培養し serum starvation を行ったのちに，無血清の DMEM 中に 1mM ポリリン酸および 10nM の EGF を添加した培養液で，15 分，30，1 時間培養し，PBS で洗浄後，タンパクを定量し，SDS－PAGE 電気泳動後， PVDF メンブレンに転写し，一次抗体に 1/1000 の ERK， JNK，p38 およびこれらのリン酸化抗体を用い，HRP 標識抗マウス二次抗体を反応させ、ECL システムで可視化し，ERK， JNK，p38 の発現およびリン酸化を解析した．

Western blot で EGF レセプターの発現を検索したところ，A431 は高い EGF レセプターの発現がみられ，A549 は量的に少ないながら EGF レセプターを発現していることが認められた．ポリリン酸を添加した 0.5% FBS DMEM にて 48 時間培養後 MTS assay を行った結果，ポリリン酸の濃度依存性に A-431 細胞，A-549 細胞の細胞増殖の亢進がみられた．1mM のポリリン酸および 10nM の EGF を含む無血清の DMEM で 24 時間培養後 に MTS assay を行ったところ，ポリリン酸単独，あるいは EGF 単独では軽度の細胞増殖活性がみられたが，EGF とポリリン酸を同時に作用させた場合には単独の場合よりも細胞増殖の亢進がみられた．MAP キナーゼのひとつである ERK の発現およびリン酸化を Western blot で検索した．A549 細胞を用い，1mM のポリリン酸および 10nM の EGF を添加した培養液で，15 分，30，1 時間培養しウェスタンブロットを行った結果，ポリリン酸と EGF 処理した場合では 15 分後に ERK のリン酸化が亢進したが， EGF 単独処理では 30 分後，ポリリン酸単独処理では 60 分後に ERK のリン酸化が亢進した．しかし ERK 自体の発現には処理や時間による差は認められなかった．A431 細胞においてもポリリン酸と EGF で処理した細胞では 15 分後に ERK のリン酸化の亢進が認められ，一方で ERK 自体の発現は A549 同様に処理による差は認められなかった．ERK 以外の MAP キナーゼである JNK，p38 の発現およびリン酸化は，ポリリン酸，EGF の処理の有無にかかわらず JNK，p38 のリン酸化の亢進は認められず，JNK， p38 自体の発現も処理による差は認められなかった．

ポリリン酸処理により EGF レセプターを発現する A431，A549 細胞は低濃度の FBS 培養条件下でも増殖が亢進した．一方，無血清培地で培養した A431 および A549 細胞はポリリン酸と EGF の共処理により，増殖活性の亢進が認められた．ポリリン酸は FGF 存在下で線維芽細胞の機能を高める報告があり，その機序は FGF - 2 を安定化し，FGF と FGF レセプターの親和性を増大する関係するとされている．一方，EGF は生体内では常に安定しており，本研究の結果，ポリリン酸が EGF を介して細胞増殖に関与する場合は，FGF とは異なった機序で関与することが示唆された．また，ポリリン酸は ERK 自体の発

現量を亢進しなかったが，EGF 受容体をもつ細胞に EGF やポリリン酸を単独で作用させた場合よりも ERK のリン酸化が EGF とポリリン酸を同時に作用させた場合，早期に亢進した．この結果は，ポリリン酸が EGF の細胞内シグナル伝達を早めることで細胞の増殖に関与することを示唆している．JNK および p38 の発現レベルはポリリン酸処理により変化はみられず，リン酸化の亢進も認められなかったことは，ポリリン酸が ERK のリン酸化を特異的に亢進することを示している．以上の結果，ポリリン酸が EGF レセプターの下流に位置する MAP キナーゼの中で ERK のリン酸化を特異的に亢進し，細胞増殖を活性化することが示唆された．

結語

1　生体からの抽出，精製と鎖長の同定等の分析が困難なため，哺乳動物における生理的役割については，ほとんど明らかにされていないポリリン酸の細胞増殖における意義について検討した．

2　ポリリン酸処理により EGF レセプターを発現する A431，A549 細胞は低濃度の FBS 培養条件下でも増殖が亢進した．

3　無血清培地で培養した A431 および A549 細胞はポリリン酸と EGF の共処理により，増殖活性の亢進が認められた．

4　EGF レセプターからのシグナル伝達により Ras の活性化，MAPKKK である Raf に結合し次に MEK のリン酸化のトリガーとなり最終的には MAP キナーゼが活性化される．今回の実験では，ポリリン酸は ERK 自体の発現量を亢進することはなかったが，EGF 受容体をもつ細胞に EGF やポリリン酸を単独で作用させた場合よりも ERK のリン酸化が EGF とポリリン酸を同時に作用させた場合，早期に亢進した．このような結果は、ポリリン酸が EGF の細胞内シグナル伝達を早めることで細胞の増殖に関与することが示唆された．

5　JNK および p38 の発現レベルはポリリン酸処理により変化はみられず，リン酸化の亢進も認められなかった．

以上の結果、ポリリン酸が EGF レセプターの下流に位置する MAP キナーゼの中で ERK のリン酸化を特異的に亢進し，細胞増殖を活性化することが示唆された．

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　戸　塚　靖　則
副　査　教　授　進　藤　正　信
副　査　教　授　鈴　木　邦　明

学位論文題名

Inorganic polyphosphate induces EGF-mediated cell proliferation by activating ERK phosphorylation

（ポリリン酸はERKリン酸化を活性化しEGFを介した細胞増殖に関与する）

審査は，審査員全員出席の下に，申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた．

審査論文の概要は，以下の通りである．

本研究は，真核細胞においてその生理的役割がほとんど解明されていないポリリン酸が，EGF/EGF レセプターによる細胞増殖にどのような役割を果たしているかについて検索したものである．

実験にはヒト扁平上皮癌細胞 A-431 とヒト肺がん細胞 A-549 を用い，10% FBS 添加 DMEM 中に 37℃，5%CO_2 の条件で維持した．ポリリン酸は平均鎖長 65 のポリリン酸ナトリウムを純水に溶解し，1N の水酸化ナトリウムで pH7.4 に調整した後に，0.45 μm のフィルターで濾過滅菌を行ったものを用いた．

細胞の増殖を MTS assay で検索した．細胞が 70～80% confluent 時にトリプシン処理し，10%FBS 添加 DMEM 中に細胞数 2000 個の割合で 96-well plate に播種し，24 時間後に細胞が定着したのを確認した．ポリリン酸を含む 0.5%FBS 添加 DMEM に交換し 48 時間培養後，通法に従い吸光度を測定し細胞増殖活性を検討した．また，細胞定着後，無血清培地で 12 時間培養後にポリリン酸および EGF を含む試験培地に交換し，24 時間培養後に同様に吸光度を測定し，EGF 刺激による細胞増殖活性にポリリン酸がどのような影響を及ぼすかについて検討した．

培養細胞の MAP キナーゼの発現を Western blot で検索した．細胞を 70～80%confluent 時に無血清培地で 12 時間培養した後に，無血清の DMEM 中に 1mM ポリリン酸および 10nM EGF を添加した培養液で 15 分，30，1 時間培養し，PBS で洗浄後にタンパクを定量した．SDS－PAGE 電気泳動後，PVDF メンブレンに転写し，一次抗体に 1/1000 の ERK，JNK，p38 およびこれらのリン酸化抗体を用い，HRP 標識抗マウス二次抗体を反応させ，ECL システムで可視化し，ERK，JNK，p38 の発現およびリン酸化を検索した．

Western blot で EGF レセプターの発現を検索したところ，A431 は高い発現を示し，A549 も量的には少ないながら EGF レセプターを発現していた．

ポリリン酸を添加した 0.5% FBS DMEM において 48 時間培養後に MTS assay を行った結果，A-431 細胞および A-549 細胞においてポリリン酸濃度依存性に細胞増殖の亢進がみられた．1mM のポリリン酸および 10nM の EGF を含む無血清の DMEM で 24 時間培養後に MTS assay を行った結果では，ポリリン酸および EGF 単独では軽度の細胞増殖活性を示したのみであったが，両者を同時に作用させた場合にはより明らかな亢進を示した．

MAP キナーゼのひとつである ERK の発現およびリン酸化を Western blot で検索した．A549 細胞を用い，1mM のポリリン酸および 10nM の EGF を添加した培養液で 15 分，30，1 時間培養して Western blot を行った結果，ポリリン酸と EGF で処理した場合は 15 分後に ERK のリン酸化が認められたが，EGF 単独処理では 30 分後，ポリリン酸単独処理では 60 分後であった．なお，ERK の発現自体に差はみられなかった．A431 細胞においても，A549 細胞と同様の結果であった．ERK 以外の MAP キナーゼである JNK，p38 に関しては，ポリリン酸および EGF の処理の有無にかかわらずリン酸化の亢進は認められず，JNK および p 38 の発現自体にも差はみられなかった．

このように，EGF レセプターを発現する A431, A549 細胞はポリリン酸処理により低濃度の FBS 培養条件下でも増殖が亢進した．一方，無血清培地で培養した A431 および A549 細胞ではポリリン酸と EGF の共処理により，増殖活性の亢進が認められた．また，ポリリン酸は ERK 自体の発現量を増加させなかったが，ERK を早期にリン酸化させた．この結果は，ポリリン酸が EGF の細胞内シグナル伝達を早めることで細胞の増殖に関与することを示唆している．他方，JNK および p38 の発現レベルはポリリン酸処理により変化せず，またリン酸化の亢進もみられなかった．

論文の審査にあたって，論文申請者による研究の要旨の説明後，本研究ならびに関連する研究について質問が行われた．

主な質問事項は，1) ポリリン酸単独で細胞増殖が活性化されるのは何故か，2) ポリリン酸の濃度をさらに高めると細胞増殖はさらに活性化されるのか，3)MTS assay の原理は，4) A431 と A549 とではEGFRにかなりの差があるが細胞増殖に同様の差がみられるのか，5) ポリリン酸の鎖長は細胞増殖活性に影響を与えるのか，等であった．いずれの質問についても，論文申請者から明快な回答が得られ，また将来の研究の方向性についても具体的に示された．本研究は，ポリリン酸が EGF レセプターの下流に位置する MAP キナーゼの中で ERK のリン酸化を特異的に亢進することにより，細胞増殖を活性化させることを明らかにした点が高く評価された．本研究の業績は，口腔外科の分野はもとより，関連領域にも寄与するところ大であり，博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた．