

ヒト膵液由来 Phospholipase A₂ による
膵癌細胞増殖促進作用
～ その発見と分子機構の究明 ～

1997

広島大学大学院医学系研究科

木下英司

【序章】

癌は、今や先進国において最大の死亡原因となっている。産業革命以降、人類が工業社会や科学技術社会を築くにしたがって、癌の発生頻度も上昇した [Lawley, 1994]。それでは、このような癌はどのようにして発生するのであろうか？ 今世紀に入り、分子細胞レベルでの研究の著しい発展が、この疑問を解決させるのに貢献してきた。

健康で正常なヒトの体を構成する 30 兆個の細胞は、それぞれが複雑なネットワークで互いに連結し合い、増殖を制御しながら生きている。実際、正常な細胞はその近傍に位置する他の細胞から指令を受けたときのみ、自己を再生し、他の細胞に有利となるよう機能するが、指令がなくなると、たちまちその再生および機能は制御を受ける。このように、細胞同士が絶えず連絡し合い、協力し合って初めて、それぞれの細胞は各種組織を形成し、必要に応じた適切な大きさと構造を維持するというホメオスタシスが成立するのである。

ところが、癌細胞はこれとは全く性質を異にする。正常な細胞と同様、他の細胞からの『増殖せよ』といった正の指令はしっかりと受け止める。しかしながら、『増殖やめ』といった周辺細胞からの負の指令には、いっこうに耳を傾けようとはせず、ただただ再生し続けたいという自己の内なる欲求のみに従おうとする。癌細胞の欲求はこればかりに留まらない。それは、最初に発生した場所から離れて周辺組織に浸潤し、さらなる新天地を求めて体内の遠く離れた場所に転移する。幸いにも、新天地にたどりつけた癌細胞は、その地で再び同じことを繰り返すのである。これこそが、癌細胞の悪性たるゆえんであり、このような悪性細胞に埋め尽くされた組織や器官は、致命的な傷を負う。やがて、それは、個体をも死に至らしめるのである。

それでは、何故、癌細胞はこのような異常増殖を起こすのか？ 一般的に、細胞の増殖を促進する信号は、細胞外から細胞膜を經由して細胞内の奥深い場所に位置する核へと分子レベルの“バトンリレー”によって伝達される。正常な細胞の核内には、このような“バトンリレー”を行うタンパク質群をコードする遺伝子群、いわゆる癌原遺伝子群が正しく存在する。ところが、これらの癌原遺伝子群の一つに何らかの要因によって変異が生じると、もはや正常な“バトンリレー”は行われず、本来は動かないはずのリレーがやみくもに走り続けてしまう。つまり、細胞内シグナル伝達機構が攪乱してしまうのである。この攪乱状態に陥った細胞が癌細胞であり、変異を受けた癌原遺伝子を癌遺伝子と呼ぶのである。癌原遺伝子の一つである *ras* 遺伝子は、分子量 21 kDa の Ras をコードし、この Ras は正常細胞の増殖の信号伝達タンパク質として重要な働きを

している [Carboni *et al.*, 1995]。ところが、突然変異を起こした *ras* 遺伝子がコードするタンパク質は、増殖因子と呼ばれる細胞外部からの信号を受けなくても、常時信号を送り続ける状態となる [Farr *et al.*, 1988]。いわば細胞は攪乱状態へ陥る。この過剰に活性化した変異 Ras は、大腸 [Konishi *et al.*, 1996]、膵臓 [Villanueva *et al.*, 1996]、肺 [Fujino *et al.*, 1995] などのヒトの癌腫で非常によく発現している。

このように、癌原遺伝子に変異すると、細胞の異常増殖を引き起こす癌遺伝子となり、その変異によって癌原遺伝子は自分がコードしている増殖促進タンパク質を過剰に産生したり、あるいは異常に高い活性をもつものを作り出したりするようになる。これに対して増殖を阻害するように働くタンパク質をコードする癌抑制遺伝子は、変異を受けて不活性化すると癌を引き起こす。この場合、癌抑制タンパク質の機能が失われ、細胞の増殖を阻止するためのブレーキがきかなくなるのである。癌抑制遺伝子の一つである *p53* 遺伝子は、*p53* タンパク質をコードし、この *p53* は細胞増殖を G₁ 期で停止させることがわかっている [Chen *et al.*, 1996]。ところが、突然変異を起こした *p53* 遺伝子がコードするタンパク質は、回り続ける細胞周期をもはや止めることができず、それ故に、細胞の癌化が進行することになるのである [Michalovitz *et al.*, 1990]。この変異 *p53* は、肝臓 [Puisieux *et al.*, 1991]、膵臓 [Lundin *et al.*, 1996] などのヒトの癌腫で非常によく検出されている。

正常な細胞では、癌原遺伝子や癌抑制遺伝子などが変異を受けるような外的刺激が与えられた場合、個々の細胞に備わっている防御機構によって、細胞が自殺（アポトーシス）させられることがある。そのような外的刺激によって、傷害を受けた細胞がアポトーシスといった死にさらされることは、その細胞自身非常につらいことであるが、個体レベルから考えると実に道理に叶っている。なぜならば、癌に至る遺伝子の変異を受けることによって個体がこうむる危険性は、一個の細胞を失うことよりもはるかにその代償が大きいからである。したがって、組織や器官に発生した癌は、遺伝的に傷害を受けた多数の細胞の中でも、どういうわけかうまくアポトーシスから逸脱した、きわめて稀な細胞から生じたと言っても過言ではないであろう。

実際に、癌細胞にはアポトーシスから逃れるためにいくつかの工夫が備わっている。前述した *p53* タンパク質は、それが持っている多くの生理機能の一つとして、アポトーシスの手助けをすることが知られている [Huang *et al.*, 1996]。ところが、多くの癌細胞で *p53* が不活化していると、もはやその細胞がアポトーシスによって排除されなくなってしまう可能性がある [Kobayashi *et al.*, 1995]。また、癌細胞のなかには、正常細胞においてアポトーシスを阻止する機能を持つ Bcl-2 タンパク質を過剰産生する細胞も

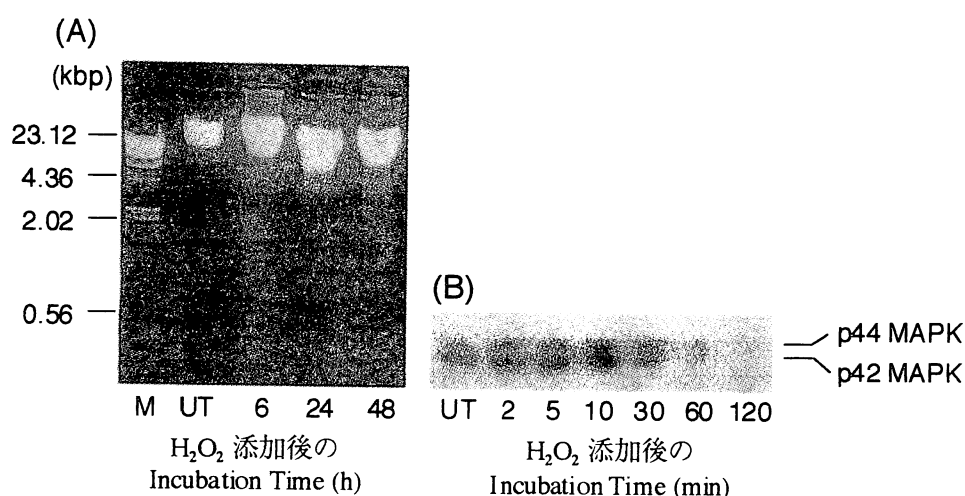


図 1. ヒト膵癌細胞株 MIA PaCa-2 の染色体 DNA に及ぼす H_2O_2 処理の影響 (A) と MAPK の活性化 (B). M: DNA size marker; UT: untreated
 (A) H_2O_2 処理後もアポトーシスに特徴的な DNA 断片化は見られない。
 (B) 抗リン酸化 p44/42 MAPK 抗体を用いた Western blot 法による解析。
 H_2O_2 処理後、短時間内に p44/42 MAPK がリン酸化し、活性化していることがわかる。

いることが報告されている [Brown & Phipps, 1996]。過酸化水素 (H_2O_2) はアポトーシスを誘導する作用がある活性酸素種としてはじめて明らかにされた分子である [Bishop *et al.*, 1987]。ところが、筆者が本研究において扱った膵癌細胞において、 H_2O_2 処理を施すとその癌細胞はアポトーシスを引き起こすどころか、細胞分裂促進タンパク質キナーゼ (MAPK) を活性化させ、とにかく生き残ろうとする (図 1)。このように、癌細胞がもっているアポトーシスから逃れる能力が、癌の増大を助けているだけでなく、癌治療に対して抵抗性にさせている点でも、人類に立ちはだかる脅威となっている。

放射線治療は、DNA に広い範囲で傷害を与えることによって、癌細胞を直接殺しているのだと信じられてきた。しかしながら、今やこの治療が、DNA に比較的小さい損傷しか与えないことを人類は気がつき始めている [Amundson & Chen, 1996; Werts *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1996]。正常細胞であれば、与えられた損傷が簡単には修復できないことを知ると、積極的にアポトーシスを図るであろう [Rosselli *et al.*, 1995]。ところが、アポトーシスから逃れる能力を備えた癌細胞はどうであろうか？ この治療に対してはるかに抵抗性の高いことが容易に予想することができるはずである。

正常な細胞には、アポトーシス機構以外にも暴走的な増殖に対抗しうる防御機構を備えている。それは、テロメア構造とよばれる染色体末端 DNA 断片が、細胞の経験した分裂回数を記録し、適切な時期に老化や細胞死を引き起こさせるのである [Greider & Blackburn 1985; Larson *et al.*, 1987; Spangler *et al.*, 1988]。こうして、細胞は無限に増

殖し続けることを制限されるのである。ところが、癌細胞はこの防御機構さえも逃れることに成功したのだ。テロメラーゼは大部分の正常細胞には存在しない（一部の正常細胞には存在する [Yasumoto *et al.*, 1996]）が、ほとんどの癌細胞に存在し [Tahara *et al.*, 1995; Tahara *et al.*, 1996]、普通なら細胞分裂ごとに短くなっていくはずのテロメア断片を修復する酵素である [Kim *et al.*, 1994]。この酵素を持つことで、癌細胞はテロメア断片の長さを保ち、無限に増殖可能となるのである。この結果、細胞は不老不死化し、癌は組織や器官の中でその大きさを明らかに増大させることになり、その個体に確実な致命傷を与えることとなる。

さらに、癌細胞は、本来なら生体内において別の生理作用を持つはずの分子までを増殖因子として利用することに成功してしまったのである。ガストリンやコレシストキニンなどはそれぞれ固有の生理機能を備えた消化管ホルモンであり、人類が生きていくために必要なホメオスタシスを維持させている。膵癌細胞には、これらの分子を信号として受けとめる受容体が存在し、この信号を核へと伝達する機構が備わっている。その結果、増殖という生体反応を起こさせるのである [Ivan *et al.*, 1994; Johnson, 1981; Smith *et al.*, 1991]。筆者が、本研究によって以下の現象を発見したことも、この意味では同様である。それは、膵臓で作られる消化酵素を、それを多量に持つ同器官に発する癌細胞が、自己の増殖に利用したという発見である。これらのことは、人類にとっては明らかに脅威であり、癌にとっては明らかに勝利である。

それでは、人類は癌に対する脅威をどのように克服すべきなのか？ それは、癌を治すための新しい治療法の開発である。しかしながら、依然、その新しい治療法は、漠然としたままである。その理由は、癌細胞が正常細胞と比べてほんの少ししか異ならない、すなわち、核の中の何万という遺伝子の中でごくごく一部分しか、悪性化にともなって傷害を受けないからである。つまり、癌細胞に向けて放った矢は、確実に癌細胞に損傷を与えるものの、それと同時に、同レベルの損傷を正常細胞にも与えてしまうというわけである。だからこそ、筆者が冒頭に述べた『癌は最大の死亡原因である』ゆえんであろう。しかしながら、癌細胞と正常細胞の間にはわずかながらも確実に違いがあることも事実である。この癌細胞だけにみられる特徴ををまさに標的としていくことが、人類が癌に勝つための最も優れた道なのである。

さて、筆者は、本研究において、これ迄の常識では考えられなかった膵臓癌の増殖と膵酵素の相関性を見出した。本研究の成果が、最終的には、膵臓癌の増殖抑制を目的とした新しい観点からの医薬品開発へと展開することを期待してやまない。

【第一章】

ヒト膵液由来 Phospholipase A₂ による膵癌細胞増殖促進作用

第一節 緒言

わが国では、膵臓癌の発生する頻度が年々増加の一途をたどっている。また、アメリカ合衆国でも、全癌死亡例中の膵臓癌による死亡率は第 4 位を占め、1 年を越える生存率は 12% にも満たない状況にある [Warshaw & Fernandez-Del Castillo, 1992]。膵臓癌の死亡率が増加する理由としては、膵臓の位置が後腹膜腔深くに位置し、かつその形が扁平であるため触診が困難で、また、自他覚症も初期には他の上腹部疾患と区別しにくいので、早期発見がきわめて困難であることが挙げられる。しかしながら、膵臓癌が消化器系癌の中でも特に悪性度が高く、予後の不良な癌であるという知見を、ただ膵臓の位置する解剖学的特異性のみより理解することは困難である。

近年の分子生物学的側面からの検討が、膵臓癌の悪性度と予後を担ういくつかの分子機構の存在を示唆するようになってきた。筆者が序章で触れたように、膵臓癌においても、各種の癌遺伝子や癌抑制遺伝子が関与することが明らかとなってきたのである。膵臓癌は、特に Ki-ras のコドン 12 の点突然変異 [Motojima *et al.*, 1991]、変異 *c-myc* [Yamada *et al.*, 1986]、変異 *c-erbB-2* [Williams, *et al.*, 1991]、あるいは変異 *p53* [Lundin, *et al.*, 1996] の出現が高率であり、これらの変異遺伝子の発現と癌の悪性度に関する研究が報告されている。また、insulin like growth factor-1 (IGF-1)、epidermal growth factor (EGF)、transforming growth factor- α (TGF- α) などの各種増殖因子、

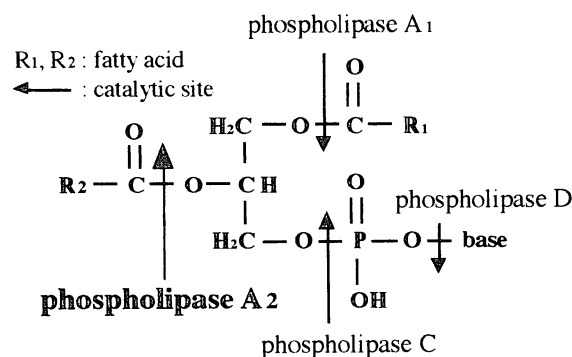


図 2. グリセリン脂質における各種 Phospholipase の活性触媒部位。Phospholipase A₂ はグリセロール 2 位にエステル結合する脂肪酸を加水分解する。その結果、リズリン脂質が作られ、脂肪酸が遊離する。

あるいは IGF-1 受容体および EGF 受容体が正常部に比べ膵癌組織で発現が亢進しているとの報告があり、膵臓癌の悪性度との相関が示唆されている [Korc *et al.*, 1992; Bergmann *et al.*, 1995; Bergmann *et al.*, 1996]。

さらに、本来生体内において特定の消化器官の運動や消化液の分泌を制御するはずの gastrin、cholecystokinin、secretin などの消化管ホルモンが、膵臓癌の増殖の一端を担っているとの発見がなされた [Jan *et al.*, 1994; Johnson, 1981; Smith *et al.*, 1991]。この発見は、筆者に、『膵臓癌が、より周辺領域に存在し、かつ、大量に接触することのできる分子を自己の増殖に利用しているのではないか』という発想を抱かせたのである。

グリセロリン脂質のグリセロール2位に結合した脂肪酸を加水分解する酵素 Phospholipase A₂ (PLA₂; EC 3. 1. 1. 4; 図 2) は、表 1 に示したように、様々なホ乳類の膵液、炎症性細胞、ヘビ毒、ハチ毒などに存在し、分子量やアミノ酸配列の違いにより、数種のタイプに分けられる [Dennis, 1994]。さらに最近、Sugiyama らは、世界に先駆けて、微生物（放線菌）より PLA₂ 遺伝子のクローニングに成功した [Sugiyama *et al.*, 1995]。これらは生物起源が異なっても、そのほとんどが触媒活性の発現に Ca²⁺ を要求する点で共通性がある (Ca²⁺ を要求しないグループも存在する [Ackermann & Dennis, 1995; Portill & Dai, 1996])。

表 1. 様々な phospholipase A₂ の分類とその性状

Source	Location	Size (kDa)	Ca ²⁺
Group I A. Cobras and kraits B. Porcine / human pancreas	Secreted	13-15	mM
Group II A. Rattlesnakes and vipers; human synovial / platelets B. Gaboon viper	Secreted	13-15	mM
Group III Bee / lizard	Secreted	12-19	mM
Group IV Raw 264.7 / rat kidney; human U937 / platelets	Cytosolic	85	mM
Group V Canine / human myocardium	Cytosolic	40	None
Group? <i>Streptomyces violaceoluber</i>	Secreted	14	μM

本酵素は、その機能として、生体膜リン脂質の生合成や代謝に関わることが知られている他、アラキドン酸遊離のトリガー酵素としても機能する PLA₂ (ヒトII型 PLA₂)

や高分子量細胞質内在型 PLA₂) があり、諸種疾患と関連付けられ、深い関心を集めている [Balsinde & Dennis, 1996; Clark *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1988; Kramer *et al.*, 1989; Seilhamer *et al.*, 1989]。一方、ヒト由来で I 型に分類される分子量 14 kDa の分泌型 PLA₂ (hPLA₂-I と呼ぶ) は、膵臓で作られ、不活性型の前駆体酵素として膵腺房細胞から膵液中へ分泌される。この不活性型 hPLA₂-I の N 末端から 7 つのアミノ酸が、十二指腸内でトリプシンによって切断され、活性型酵素となる [de Haas *et al.*, 1968]。これまで、活性型 hPLA₂-I は、主に、胆汁の界面活性作用により乳化した食物中のリン脂質を消化するために存在するものと考えられてきた。ところが、近年の分子生物学の発展に伴って、hPLA₂-I が膵臓以外に肺や脾臓などの非消化器官でも作られていること [Sakata *et al.*, 1989; Tojo *et al.*, 1988]、また、トリプシン以外にも、血漿中に含まれるプラスミンなどのプロテアーゼによって活性型酵素に変換されることが明らかとなった [Nakano *et al.*, 1994]。これらの事実は、hPLA₂-I の生理機能を食物消化のみに限定すべきではないことを意味し、これがヒントとなって、最近ではこの膵液由来 PLA₂-I の特異的受容体および新規の生理作用の発見がなされている [Arita *et al.*, 1991; Kanemasa *et al.*, 1992; Kishino *et al.*, 1992; Nakajima *et al.*, 1992; Tohkin *et al.*, 1993]。

筆者は、本研究において、ヒトの膵臓で作られる hPLA₂-I がヒト由来の膵癌細胞の増殖を促進するという、これ迄の常識では考えられなかった現象を世界で最初に発見した。そこで、hPLA₂-I が如何に膵癌細胞の増殖を誘導するのかを明らかにすることを目的とした。

第二節 ヒト膵液からの hPLA₂-I の単離精製

hPLA₂-I の単離精製法の確立は非常に歴史が長く、1962 年 Magee らが、ヒト膵組織において hPLA₂-I の存在とその精製を報告したことから端を発した [Magee *et al.*, 1962]。その後、数多くの精製法が開発され、hPLA₂-I が強酸性 (pH 4.0) で、かつ、高温 (70℃) 下においても安定であることが報告された [Figarella *et al.*, 1971; Grataroli *et al.*, 1981; Verheij *et al.*, 1981]。

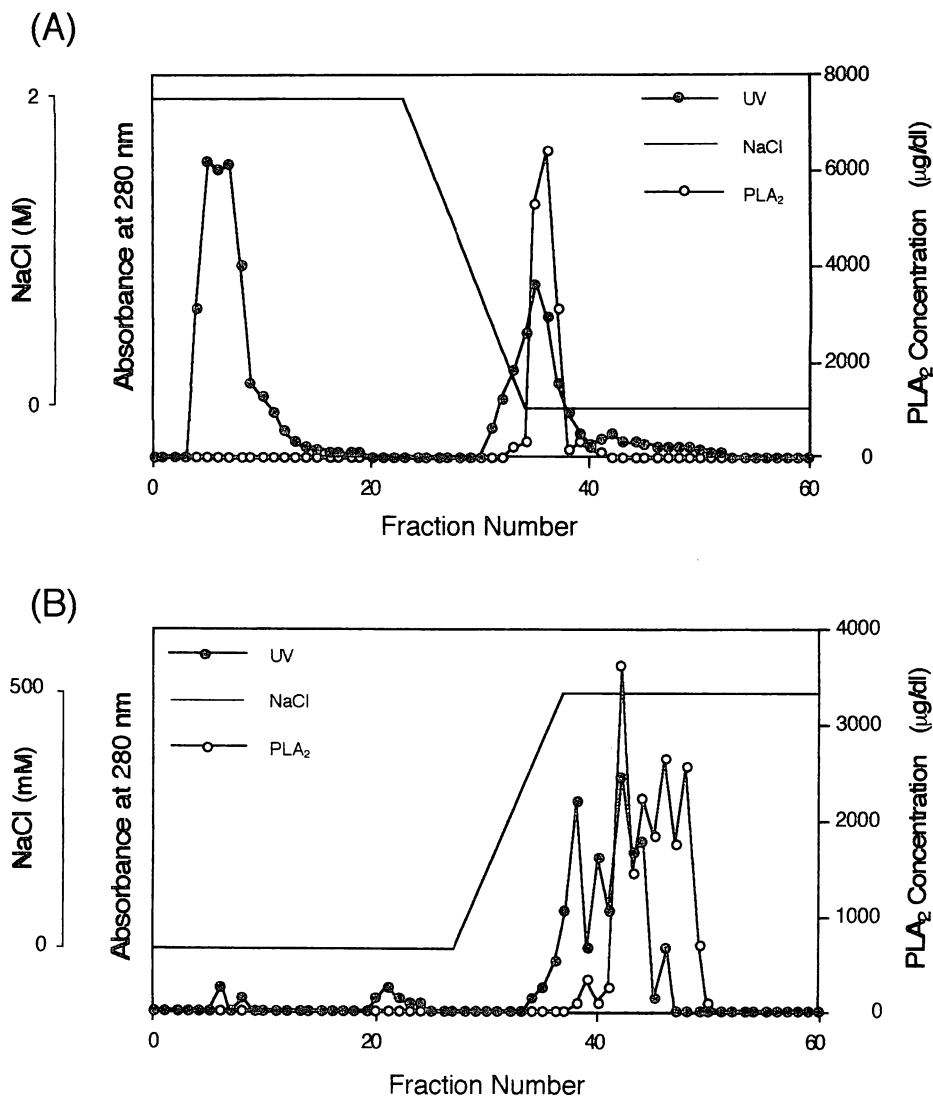


図 3. Octyl-Sepharose column (A) および CM-Sepharose column (B) からのタンパク質溶出図。hPLA₂-I 濃度の定量はシオノリア膵 PLA₂ キット (Shionogi) を用いて行った。

本研究におけるヒト膵液からの hPLA₂-I の単離精製は、Nishijima らの方法 [Nishijima *et al.*, 1983] に従って行った。まず、膵頭十二指腸切除術を受けた患者の膵

管ドレナージチューブより得られた大量のヒト膵液を pH 5.0、-80℃ で保存し、解凍後 24 時間、5 mM sodium acetate (pH 5.0) で透析し、凍結乾燥した。凍結乾燥品を 50 mM sodium acetate、2M NaCl (pH 5.0) に溶解後、pH 5.0 で 60℃、5 分間熱処理を加えた。PLA₂ は疎水性タンパク質なので、一旦、Octyl-Sepharose column に結合させた後、塩濃度を低下させることによって溶出した (図 3 A)。最終的には CM-Sepharose column にかけることにより (図 3 B)、単一タンパク質として得ることに成功した (図 4 A; 分子量 14 kDa)。図 4 B には抗 hPLA₂-I モノクローナル抗体を用いて Western blot 解析した結果を示した。このようにして得られた精製タンパク質をペプチド自動シーケンサー (PSQ-2, Shimadzu) にかき、N 末端から 20 アミノ酸残基を決定した結果、トリプシンで切断された後に生ずる N 末端アミノ酸配列と 100% 一致したことから (図 4 C)、活性型 hPLA₂-I であると結論した。この精製 hPLA₂-I はその消化酵素反応の至適 pH が 8.0 ~ 9.0 (図 5) で、Ca²⁺ 依存性 (図 11 A) を示し、かつ、グリセリン脂質のグリセロール 2 位に結合した脂肪酸を特異的に加水分解した。

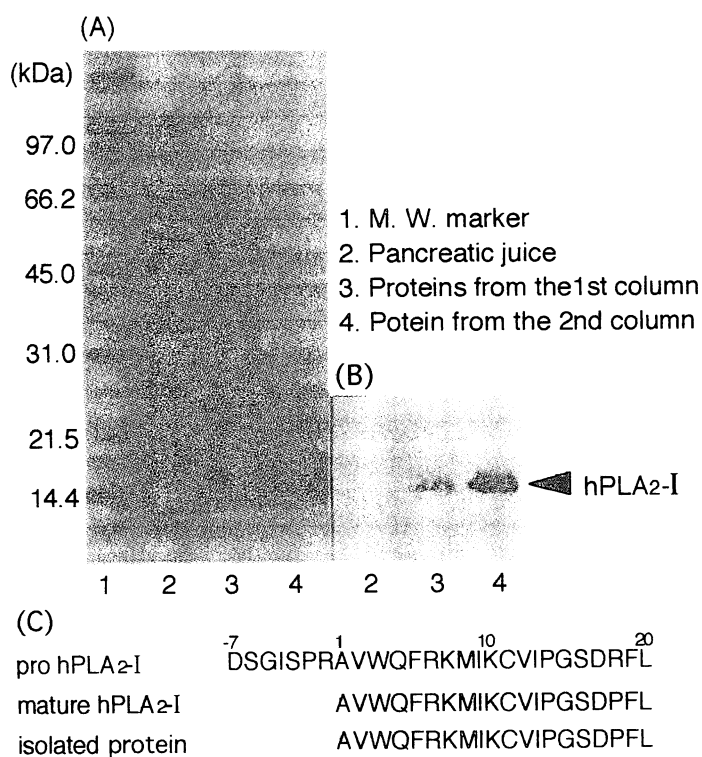


図 4. ヒト膵液から単離精製された活性型 hPLA₂-I.
 (A) Tricine SDS-PAGE による解析.
 (B) Western blot 法による解析.
 (C) ペプチド自動シーケンサーによる N 末端 20 アミノ酸残基の決定.

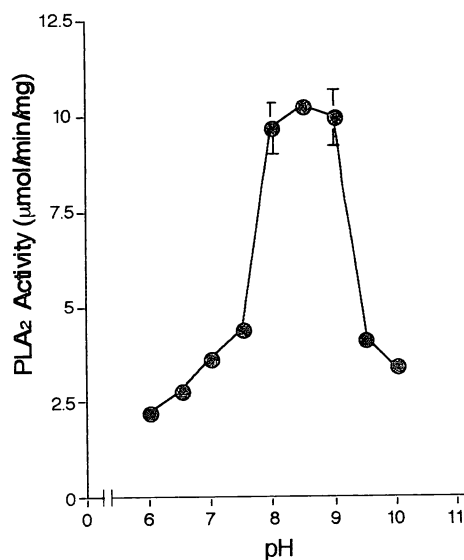


図 5. hPLA₂-I 活性に対する pH の影響.
 80 mM Tris-Acetate (pH 6.0-7.5),
 80 mM Tris-HCl (pH 7.5-8.5),
 80 mM glycine-NaOH (pH 8.5-10.0)
 の緩衝液を使用した.

第三節 活性型 hPLA₂-I による MIAPaCa-2 の増殖促進作用

Japanese Cancer Reserch Resources Bank より入手した未分化ヒト膵腺癌細胞株である MIAPaCa-2 [Madden *et al.*, 1989] への活性型 hPLA₂-I の添加実験を試みた。トリパンブルー染色後の白血球計算板による細胞数の計測および WST-1 (Cell Counting Kit, Dojindo) を利用した吸光度による細胞数の算出を行った結果、両測定法において、活性型 hPLA₂-I を 25 ~ 50 nM 添加することにより、共に、MIAPaCa-2 の明らかな細胞数の上昇が観察された (図 6)。なお、測定の際の培養液に含ませる胎児牛血清 (FBS) の濃度は 0.1% である。この結果から、以降の実験における MIAPaCa-2 への hPLA₂-I 添加濃度は 50 nM とした。

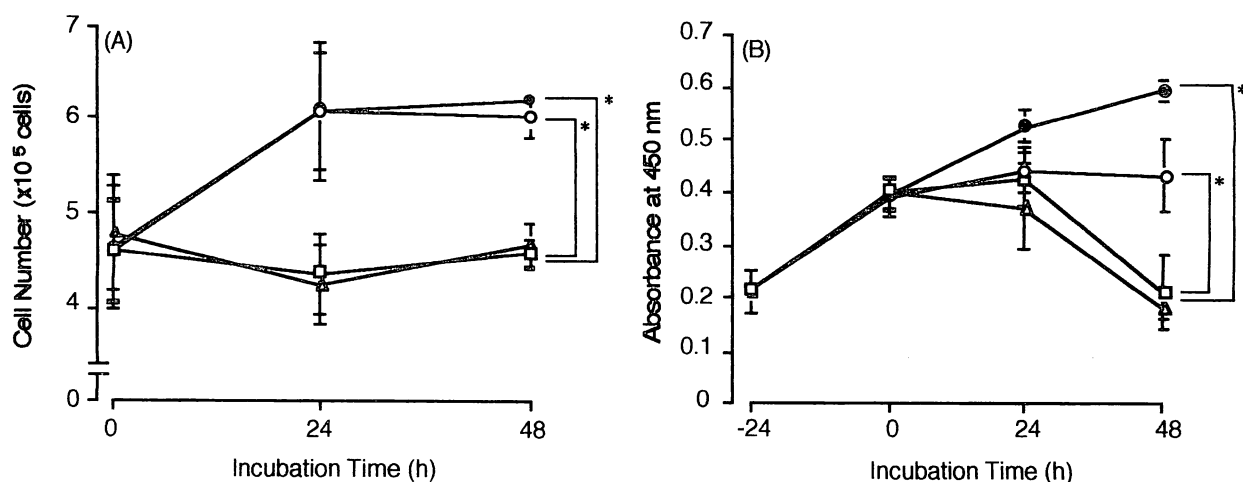


図 6. 活性型 hPLA₂-I によるヒト膵癌細胞株 MIAPaCa-2 の増殖効果。

(A) 白血球計算板による細胞数の計測. *P < 0.05

(B) WST-1 を利用した吸光度による細胞数の算出. *P < 0.05

(●: 50 nM ○: 25 nM △: 10 nM □: 0 nM)

次に、抗 hPLA₂-I 抗体 (20 μg/ml) を用いて抗原-抗体複合体を作製し、hPLA₂-I の酵素活性および膵癌細胞増殖活性に与える影響を調べた。その結果、22℃にて1時間前処理後の抗原-抗体複合体の酵素活性は、未処理の hPLA₂-I の酵素活性に比べて約 90% 阻害された (図 7 A; なお、100% PLA₂ 活性は 3.0 μmol/mim/mg である)。さらに、その複合体を MIAPaCa-2 に添加したところ、もはや hPLA₂-I の増殖効果は観察されなかった (図 7 B)。これらのことから、hPLA₂-I を至適濃度添加することによって MIAPaCa-2 の増殖が促進されるが、その際、抗 hPLA₂-I 抗体と抗原-抗体複合体を

形成すると、膵癌細胞の増殖促進作用と酵素活性が共に失われることが明らかとなった。

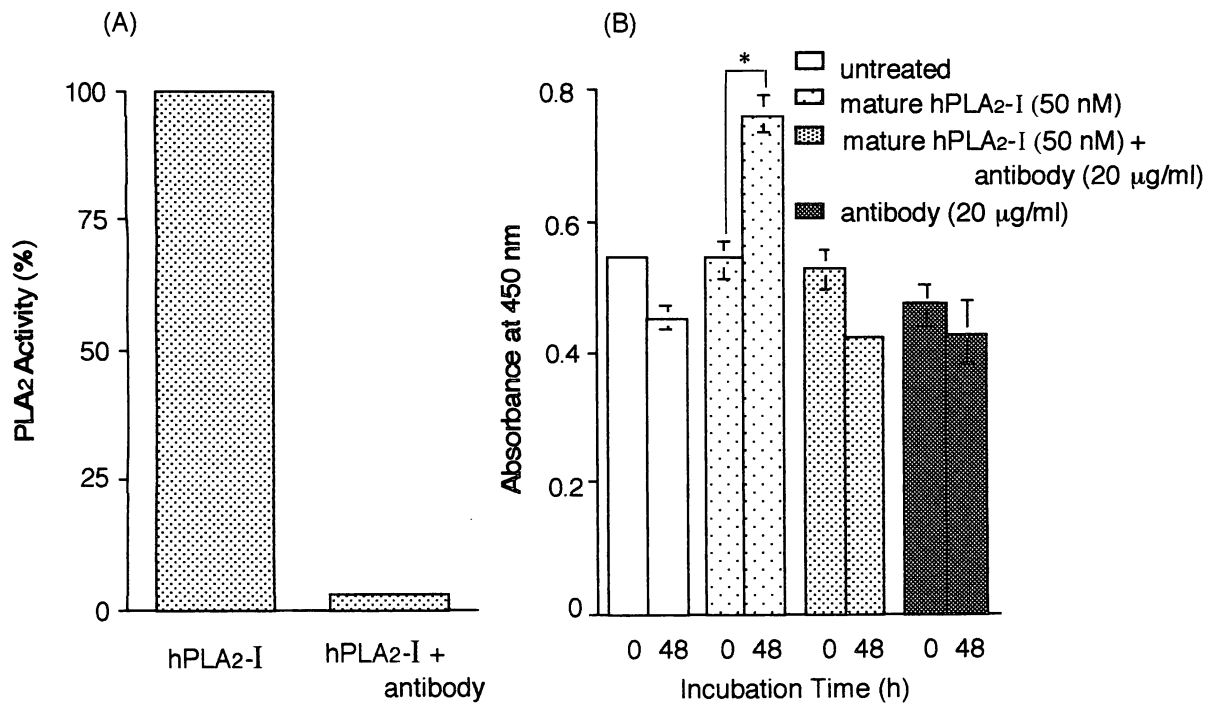


図 7. 活性型 hPLA₂-I の酵素活性 (A) および増殖活性 (B) に与える抗 hPLA₂-I モノクローナル抗体の影響.
 * $P < 0.05$

第四節 MIAPaCa-2 における活性型 hPLA₂-I 受容体の発見

hPLA₂-I による食物消化以外の生理作用、すなわち、本研究において新たに発見したヒト膵癌細胞株増殖促進作用を考えるために筆者が注目したのは、増殖因子のような生理活性タンパク質の多くが、特異的な受容体を介して生体膜上に結合した後、細胞内のシグナル伝達カスケードにより特定の遺伝子の発現を行っているという事実である。そこで、hPLA₂-I による膵癌細胞増殖促進機構を明らかにするための一助として、MIAPaCa-2 におけるhPLA₂-I 受容体存在の有無を調べることにした。まず、精製したhPLA₂-I をクロラミン T 法 [Hunter & Greenwood, 1962] によって放射性ヨウ素 [¹²⁵I] で標識し、MIAPaCa-2 への [¹²⁵I]-hPLA₂-I の結合親和性を調べた (図 8)。Scatchard プロット解析の結果、最大結合能が 0.43 fmol/10⁶ cells、K_d 値 (解離定数) が 2.6 nM の単一結合部位である活性型 hPLA₂-I 受容体の存在が確認された (図 8 B)。

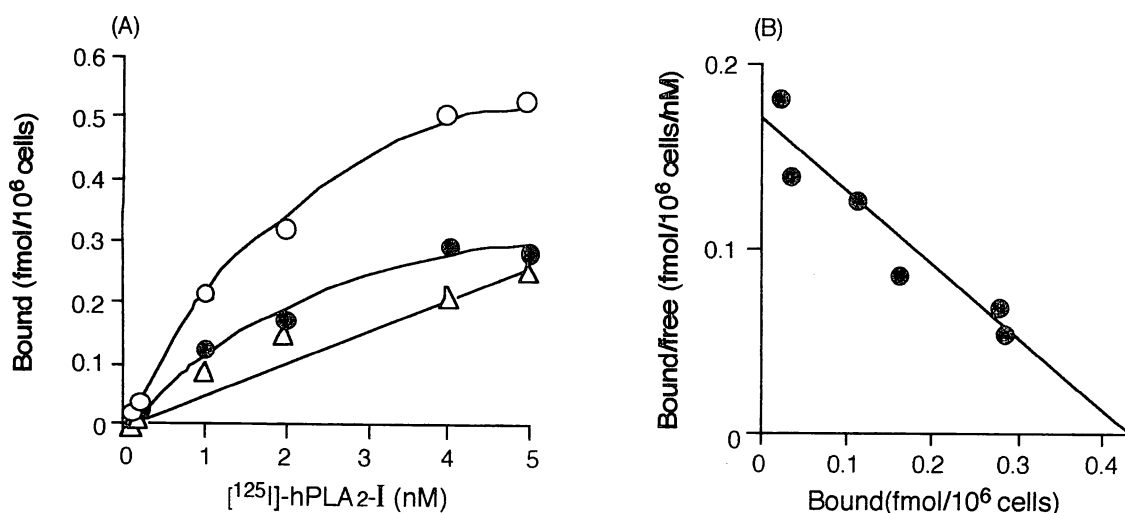


図 8. ヒト膵癌細胞株 MIAPaCa-2 に対する [¹²⁵I] で標識した活性型 hPLA₂-I の結合測定。
 (A) MIAPaCa-2 癌細胞株への [¹²⁵I]-hPLA₂-I の結合曲線。
 (○; 全結合値 △; 非特異的結合値 ●; 特異的結合値)
 (B) [¹²⁵I]-hPLA₂-I の特異的結合値に基づく Scatchard プロット解析。

第五節 MIAPaCa-2 が持つ hPLA₂-I 受容体の認識特異性

hPLA₂-I 以外の分泌型 PLA₂ にも MIAPaCa-2 の増殖促進作用があるのではないかと予想される。そこで、様々な分泌型の PLA₂ として、ヒト膵臓由来の不活性型 PLA₂ (pro-hPLA₂-I)、ウミヘビ毒 (タイプ I 型)、マムシ毒 (タイプ II 型)、ハチ毒 (タイプ III 型) 由来の PLA₂ ならびに放線菌由来の PLA₂ について、hPLA₂-I と同様に Cell Counting Kit (Dojindo) を用いて、MIAPaCa-2 の増殖促進効果を検討した。その結果、この細胞増殖促進作用は、活性型 hPLA₂-I に特異的であることが示された (図 9)。なお、用いた各種 PLA₂ の最終濃度は 50 nM である。

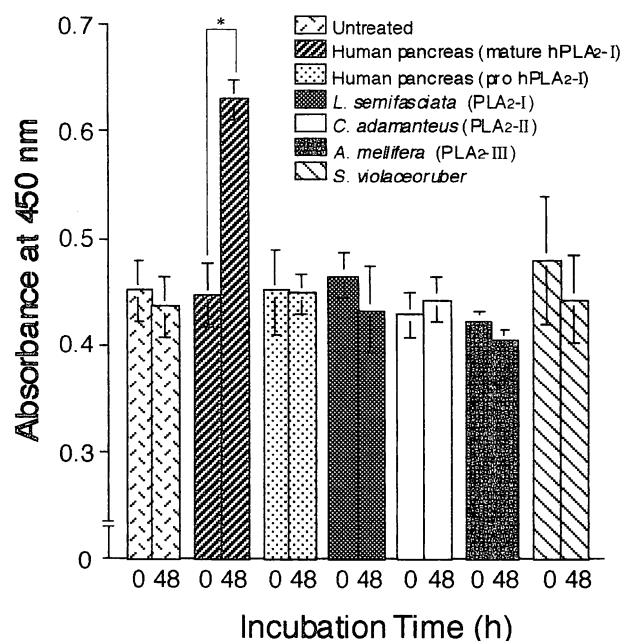


図 9. 様々な PLA₂ によるヒト膵癌細胞株 MIAPaCa-2 の増殖効果。活性型 hPLA₂-I には増殖活性が認められるものの、pro-hPLA₂-I、ウミヘビ毒、マムシ毒、ハチ毒由来の PLA₂ ならびに放線菌由来の PLA₂ には増殖活性が認められない。* $P < 0.05$

さらに、MIAPaCa-2 の有する PLA₂ 受容体のリガンド認識特異性についても調べた。すなわち、¹²⁵I-hPLA₂-I の結合阻害実験 (図 10) から得た各種 PLA₂ の 50% 結合阻害濃度 (IC₅₀) をリガンドの親和性の尺度として検討した結果、hPLA₂-I の IC₅₀ 値が約 3.5 nM であるのに対し、不活性型 hPLA₂-I (pro-hPLA₂-I) では 500 nM 添加しても 50% 阻害を与えなかった (図 10、表 1)。また、ヘビ毒・ハチ毒由来の PLA₂、放線菌由来の PLA₂ でも結合阻害がほとんど見られず、IC₅₀ 値が mM オーダー以上であることが示された (表 1)。これらの結果は、この受容体が活性型 hPLA₂-I のみを特異

的に認識していることを示している。さらに、増殖促進作用発現における PLA₂ 特異性が PLA₂ 受容体のリガンド認識特異性と一致することから、hPLA₂-I によって促進される MIAPaCa-2 の増殖作用は活性型 hPLA₂-I に特異的な受容体を介して行われる生体反応であると示唆された。

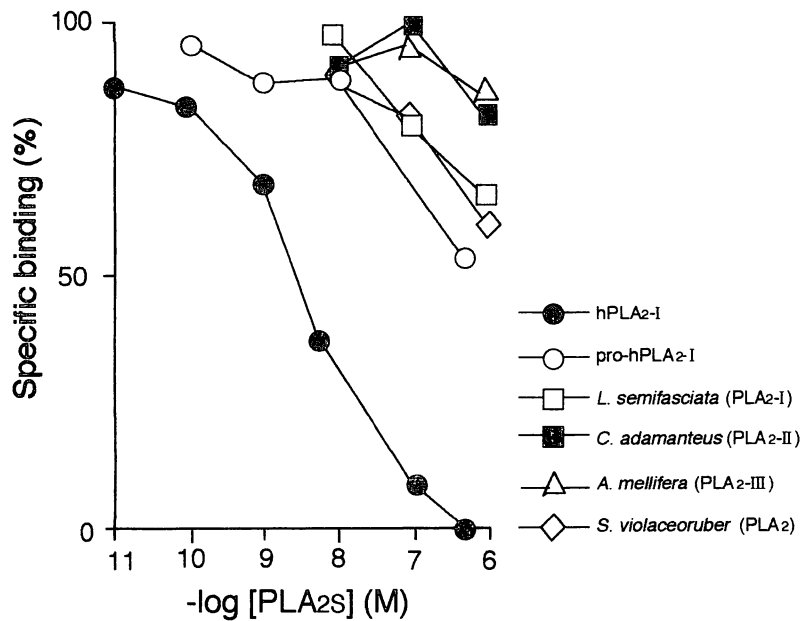


図 10. 様々なPLA₂ による¹²⁵I-hPLA₂-I の特異的結合の阻害効果。hPLA₂-I によって完全に結合は阻害されたが、不活性型の前駆体酵素である pro-hPLA₂-I、ヘビ毒、ハチ毒、放線菌由来の PLA₂ にはほとんど結合阻害が認められなかった。

表 2. MIAPaCa-2 が持つPLA₂ 受容体のリガンド認識特異性

PLA ₂ s	IC ₅₀ value (M)
hPLA ₂ -I	3.5 X 10 ⁻⁹
pro-hPLA ₂ -I	> 5.0 X 10 ⁻⁷
<i>L. semifasciata</i> (PLA ₂ -I)	> 1.0 X 10 ⁻⁶
<i>C. adamanteus</i> (PLA ₂ -II)	> 1.0 X 10 ⁻⁶
<i>A. mellifera</i> (PLA ₂ -III)	> 1.0 X 10 ⁻⁶
<i>S. violaceoruber</i> (PLA ₂)	> 1.0 X 10 ⁻⁶

受容体に対する結合特異性は MIAPaCa-2 に対する¹²⁵I]-hPLA₂-I の結合を 50% 阻害する各 PLA₂ の濃度 (IC₅₀) で表わした。

第六節 第一章のまとめ

1. ヒト膵液から活性型 hPLA₂-I の単離精製に成功した。
2. 至適濃度の活性型 hPLA₂-I によって、未分化ヒト膵腺癌細胞である MIAPaCa-2 の増殖が誘導された。
3. 抗 hPLA₂-I 抗体によって、hPLA₂-I の MIAPaCa-2 増殖促進作用と消化酵素活性が共に失われた。
4. MIAPaCa-2 の生体膜上には、活性型 hPLA₂-I に親和性を示す (*K_d* 値; 2.6 nM) 受容体が存在した。
5. ヒト膵臓由来の不活性型 PLA₂ (pro-hPLA₂-I)、ウミヘビ毒、マムシ毒、ハチ毒由来の PLA₂ ならびに放線菌由来の PLA₂ には、MIAPaCa-2 の増殖促進作用がなかった。
6. 4 に記した受容体は、活性型 hPLA₂-I を強く認識するが、ヒト膵臓由来の不活性型 PLA₂ (pro-hPLA₂-I)、ウミヘビ毒、マムシ毒、ハチ毒由来の PLA₂ ならびに放線菌由来の PLA₂ を認識しなかった。
7. 増殖促進作用発現における PLA₂ 特異性、および PLA₂ 受容体のリガンド認識特異性の一致から、hPLA₂-I によって誘導される MIAPaCa-2 の増殖作用は活性型 hPLA₂-I に特異的な受容体を介して行われる生体反応であると示された。

【第二章】

ヒト膵液由来 Phospholipase A₂ による脂質分解酵素活性 非依存的膵癌細胞増殖促進作用

第一節 緒言

近年、hPLA₂-I と急性膵炎をはじめとした各種重要臓器疾患の発生機序との相関性が注目を集めている。

急性膵炎の発生機序としては、膵液中に含まれる活性型 hPLA₂-I の間質内逸脱による化学的な自己消化がその本態をなしている [Kimura *et al.*, 1993; Papp *et al.*, 1973]。膵液中の hPLA₂-I は本来、十二指腸内で活性化を受け、はじめて消化酵素として機能を発揮するが、急性膵炎では胆汁、特に細菌による感染胆汁の混入により膵管内で活性化が起こり、その活性値は正常膵のものとは著しく上昇することが示されている [Keynes, 1980]。また、急性膵炎患者の血中において、hPLA₂-I の濃度とその活性値が共に高い値を示すことが報告されている [Doizaki & Zieve, 1966; Hatao, 1969; Nishijima *et al.*, 1983; Schröder *et al.*, 1980; Zieve & Vogel, 1961]。しかしながら、現在のところ hPLA₂-I に対する阻害物質の存在はヒトでは知られていない。したがって、重症膵炎時に膵管内の活性型 hPLA₂-I が血中に大量移行すると、血流循環に伴って全身の重要臓器の障害、例えば腎障害や肺障害などの重篤な合併症が発生する可能性が指摘されてきた [Schröder *et al.*, 1982; Wells & Schenk, 1984]。これら重要臓器疾患に対する hPLA₂-I の生理作用は、細胞膜の主要成分であるリン脂質を分解する作用であって、これによる細胞膜の構成成分の変化に起因する細胞膜障害 [Kimura *et al.*, 1993; Papp *et al.*, 1973] と、hPLA₂-I の消化分解産物である lysophosphatidylcholine (Lyso-PC) の強い細胞毒性 [Holm, *et al.*, 1991; Schick *et al.*, 1987] として理解することができる。また、十二指腸液の胃内逆流による胃潰瘍、あるいは膵液の胆道内逆流による肝胆道系障害などの消化器系疾患にも、hPLA₂-I の消化酵素活性の関与とその意義が強く示唆されている [Bückler *et al.*, 1989; Yoshida, 1983]。

一方、急性膵炎に伴って血中移行した活性型 hPLA₂-I は各種臓器の細胞障害を与える他、様々な生理現象にも影響を与えることが知られている。すなわち、hPLA₂-I の消化分解産物である Lyso-PC が、マクロファージにおけるその活性化と酸化 LDL (low

density lipoprotein) の取り込みを伴った泡沫細胞形成に関与すること [Sakai *et al.*, 1996] や、T リンパ球における interleukin-2- α 受容体の発現能とタンパク質キナーゼ C (PKC) の活性化を介した DNA 合成能に関与すること [Asaoka *et al.*, 1992] が示唆されている。また、Na⁺/K⁺-ATPase、あるいは guanylate cyclase および adenylyate cyclase といった生体膜結合タンパク質を活性化し、その代謝に重要な役割を果たすことも報告されている [Oishi *et al.*, 1990; Shier *et al.*, 1976]。

最近、血管内皮細胞において Lyso-PC が VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) および MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) といった接着分子の発現を高め、その結果、血管内皮細胞への単球あるいは T リンパ球の接着を誘導し、さらにそれらの遊走能を高めることが証明された [Kume *et al.*, 1992; Takahara *et al.*, 1996; Yokote *et al.*, 1993]。この発見は、アテローム性動脈硬化の初期病変と hPLA₂-I の消化酵素活性との相関性を示唆するものであり深い関心を集めている。

もし、この現象が接着性を失った癌細胞にも同様に起こった場合はどうであろうか？ 癌の悪性形質の一つである浸潤・転移は、その過程に接着分子の発現を必須とする。すなわち、癌細胞の標的マトリックスへの集積能と運動性を考える場合、このことが最も重要な点となることは言うまでもない。実際、ICAM-1、インテグリン、あるいは CD44 などの接着分子の発現が、癌の転移能と悪性度に正の相関性があると報告されている [Burno *et al.*, 1996; Matsuura *et al.*, 1996; Streit *et al.*, 1996]。いわゆる“足場依存性”を消失し血管中に浮遊した癌細胞が、接着因子誘導作用を有する Lyso-PC の影響を受けたならば、癌の浸潤・転移と hPLA₂-I の消化酵素活性との有意な相関性を予想することは容易である。現在までにこのことを示唆する研究報告は存在しない。

さて、hPLA₂-I による膵癌細胞増殖促進作用が特異的受容体を介した生体反応であることは、既に第一章において述べた通りである。それでは、この生体反応は果たして hPLA₂-I の消化酵素活性を介するものであろうか？ 実際、生体内における病態と hPLA₂-I の生理作用を報じた論文はこれまでに数多く存在するが、そのすべては hPLA₂-I の消化酵素活性を介したものである。そこで、第二章では、hPLA₂-I の膵癌細胞増殖促進作用に対して、hPLA₂-I の消化酵素活性が必要であるか否かを明らかにすることを目的とした。

第二節 hPLA₂-I の特異的受容体結合への Ca²⁺ 非依存性

hPLA₂-I がグリセロール 2 位に結合した脂肪酸を加水分解する酵素反応を進行させるためには、mM オーダーの Ca²⁺ を要求する [Dennis, 1994]。そこで、hPLA₂-I が MIAPaCa-2 の持つ hPLA₂-I 特異的受容体に結合する際に、Ca²⁺ を要求するか否か調べた。Ca²⁺ キレート剤である EDTA (2 mM) 存在下において PLA₂ 酵素活性を測定したところ、その活性は約 70% 阻害された (図 11 A)。しかしながら、¹²⁵I]-hPLA₂-I の特異的結合は EDTA の有無に関わらず認められた (図 11 B)。以上のことから、hPLA₂-I が MIAPaCa-2 の持つ特異的受容体に結合する際には、Ca²⁺ を要求しないことが明らかとなった。

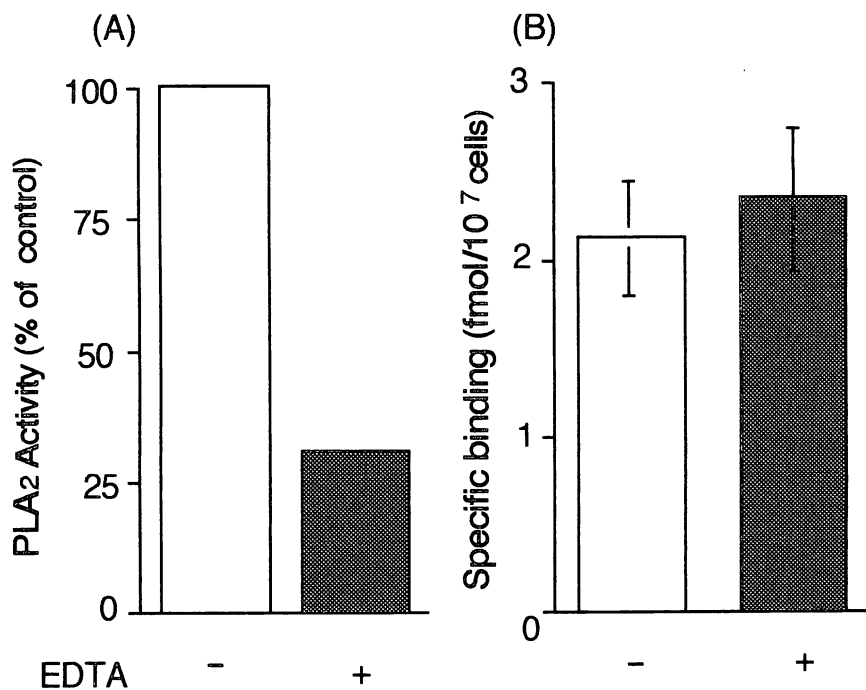


図 11. hPLA₂-I の酵素活性 (A) および特異的受容体への結合 (B) に与える Ca²⁺ の影響.
(A) hPLA₂-I の酵素活性は 2 mM EDTA の存在 (+) および非存在下 (-) で測定した.
なお、100% hPLA₂-I 酵素活性は 17.5 μmol/min/mg である.
(B) hPLA₂-I の特異的受容体への結合は (A) と同じ条件下の Hanks' solution 中において
¹²⁵I]-hPLA₂-I を添加してから 4 時間、4℃ で MIAPaCa-2 を培養後、測定した。

第三節 MIAPaCa-2 におけるリゾリン脂質の生理作用

次に、PLA₂ の消化分解産物である リゾリン脂質 が MIAPaCa-2 の増殖を促進するか否か調べた。これまでにリゾリン脂質、特に Lyso-PC は、PKC の活性およびいくつかの増殖因子の発現を高めることから、細胞増殖促進作用に重要な役割を果たしていると示唆されている [Oishi *et al.*, 1988; Kume & Gimbrone, 1994]。もし、hPLA₂-I による MIAPaCa-2 の増殖促進作用が PLA₂ 酵素活性を介した生体反応であるならば、リゾリン脂質が増殖効果を示す可能性が考えられる。そこで、様々な種類および濃度のリゾリン脂質 (Lyso-PC、lysophosphatidylethanolamine; Lyso-PE、lysophosphatidylglycerol; Lyso-PG および lysophosphatidylinositol; Lyso-PI) の添加実験を試み、その増殖促進作用を調べた。その結果、特に高濃度の Lyso-PC (10⁵ g/ml) では細胞毒性は認められたものの (図 12 A)、リゾリン脂質には増殖促進作用は認められなかった (図 12)。

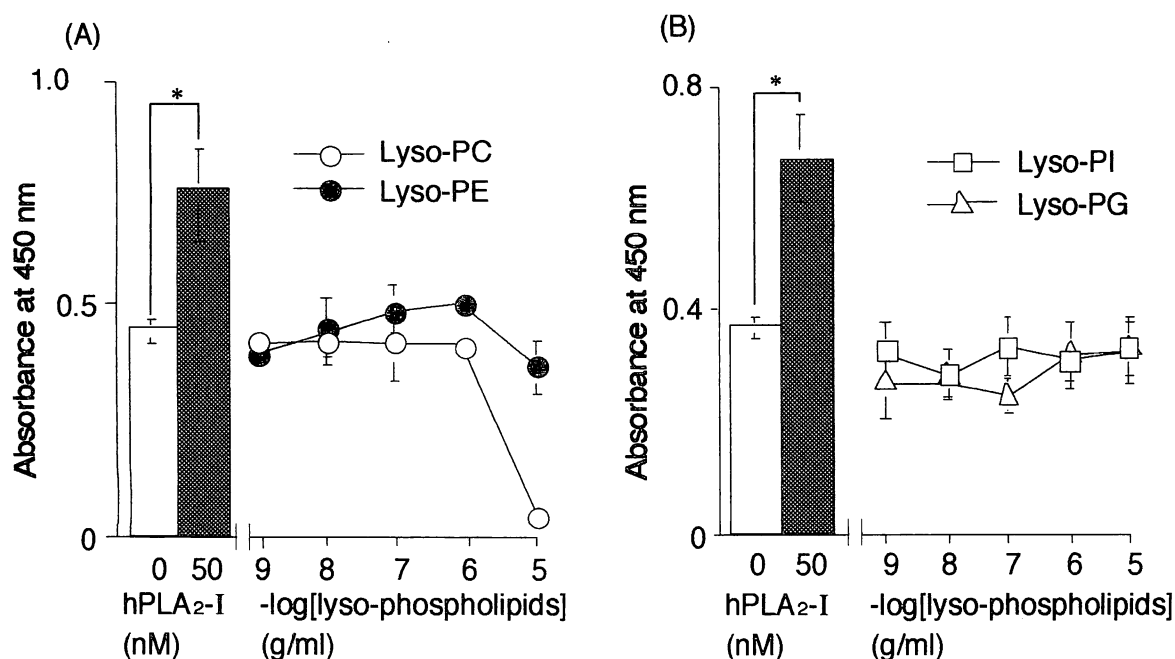


図 12. 様々なリゾリン脂質によるヒト臍癌細胞株 MIAPaCa-2 の増殖効果.

次に、様々な濃度の Lyso-PC (10⁹ ~ 10⁵ g/ml) を添加してから MIAPaCa-2 を 48 時間培養後、50 nM hPLA₂-I を含む新鮮な培養液に交換し、引き続き 48 時間培養した後 Cell Counting Kit (Dojindo) を用いて細胞数を吸光度として計測した。10⁹ ~ 10⁶ g/ml の Lyso-PC で前処理した MIAPaCa-2 は、50 nM hPLA₂-I を含む新鮮な培養液

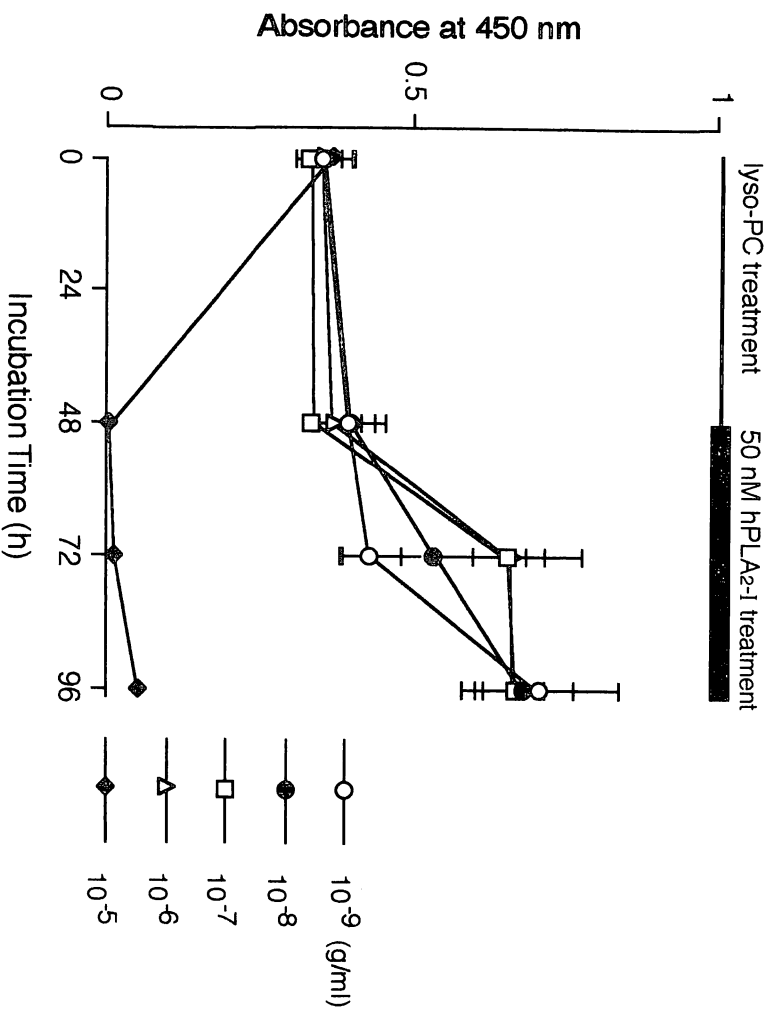


図 13. lysophosphatidylcholine ($10^{-9} \sim 10^{-5}$ g/ml) 前処理後における hPLA₂-1 の与える MIAPaCa-2 増殖促進効果.

に交換した後も再び細胞数は上昇した (図 13)。しかしながら、 10^5 g/ml といった高濃度の Lyso-PC で前処理した MIAPaCa-2 は、もはや細胞数の上昇を観察することはできなかつた (図 13)。これらの結果から、リゾリン脂質には MIAPaCa-2 の増殖促進効果がないうこと、および、高濃度 (10^5 g/ml) の Lyso-PC は MIAPaCa-2 に対して強い細胞毒性を示すことが明らかとなった。

第四節 hPLA₂-I による MIAPaCa-2 生体膜からの遅延的アラキドン酸遊離作用

MIAPaCa-2 に 50 nM および 5 μM の高濃度の hPLA₂-I を添加し、その培養上清中に遊離される細胞膜由来の脂肪酸の検出を試みた。しかしながら、hPLA₂-I 添加後、2 および 24 時間培養後に調べた結果、その培養上清中に遊離脂肪酸はほとんど認められなかった (図 14)。

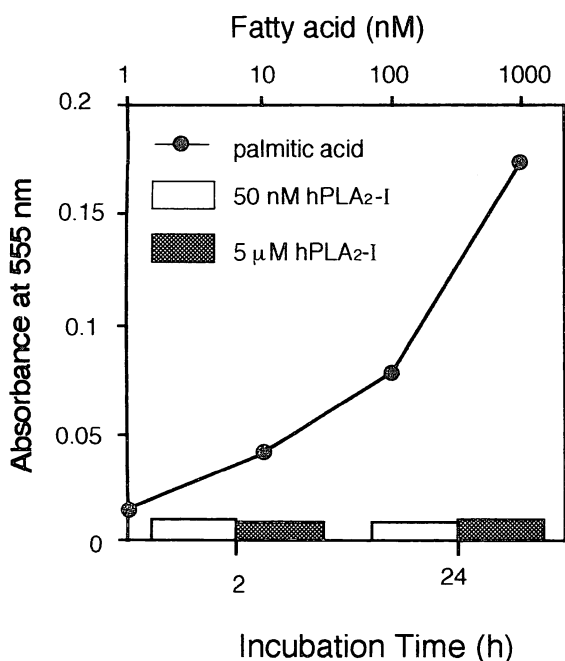


図 14. hPLA₂-I 添加後の MIAPaCa-2 から放出される全脂肪酸量。●: パルミチン酸のコントロール吸光度

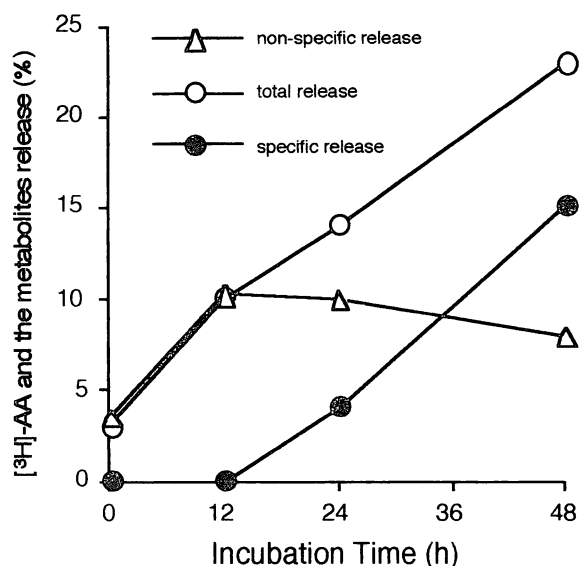


図 15. hPLA₂-I 添加後の MIAPaCa-2 から放出されるアラキドン酸およびその代謝物。

一方、³H]-アラキドン酸を MIAPaCa-2 に代謝標識し、hPLA₂-I 添加後に ³H]-アラキドン酸およびその代謝物が放出されるか否か調べた。その結果、50 nM hPLA₂-I 添加後 48 時間培養することにより、培養上清中への有意な ³H]-アラキドン酸およびその代謝物の放出を認めた (図 15)。

アラキドン酸代謝物が細胞増殖促進作用やアポトーシス誘導作用をはじめとする様々な生理作用に関与すること、また、その生理作用はアラキドン酸代謝酵素の阻害剤である indomethacin (シクロオキシゲナーゼ阻害剤) あるいは nordihydroguaiaretic acid (リポキシゲナーゼ阻害剤) を加えることにより一様に抑制されることが報告されている [Burkey & Regan, 1995; Korystov, *et al.*, 1996]。しかしながら、本研究においては、高濃度の indomethacin および nordihydroguaiaretic acid を加えても、hPLA₂-I による

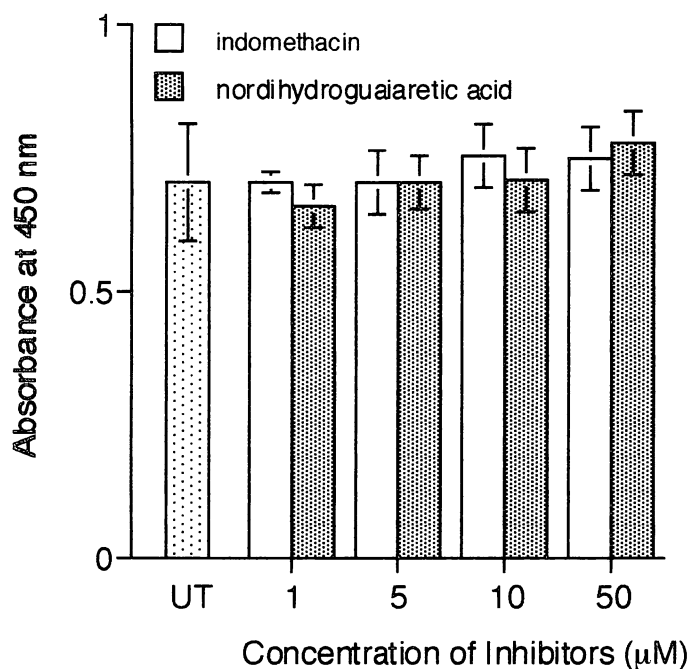


図 16. hPLA₂-I のヒト膵癌細胞株 MIA PaCa-2 増殖促進作用に与えるアラキドン酸代謝亢進酵素阻害剤の影響。細胞増殖活性は 50 nM hPLA₂-I を添加後、さらに様々な濃度の阻害剤で処理し、48 時間培養してから測定した。UT; untreated by inhibitors.

MIA PaCa-2 増殖促進作用が抑制されなかった (図 16)。hPLA₂-I による MIA PaCa-2 の増殖促進作用が 48 時間以内に起こること (図 6)、また、アラキドン酸代謝酵素の阻害剤である indomethacin および nordihydroguaiaretic acid を加えても、hPLA₂-I による細胞増殖促進作用が起こることから判断すると、hPLA₂-I によって誘導される生体膜からのアラキドン酸およびその代謝物の放出が MIA PaCa-2 の増殖効果に影響を及ぼさないことが強く示唆された。

以上のことから、予想される hPLA₂-I の作用動態モデルを図 17 に示した。これまでの実験結果から判断して、hPLA₂-I によって誘導される MIA PaCa-2 増殖促進作用は、hPLA₂-I の消化酵素としての活性を介する反応ではなく、hPLA₂-I の特異的受容体を介する応答であると結論した。

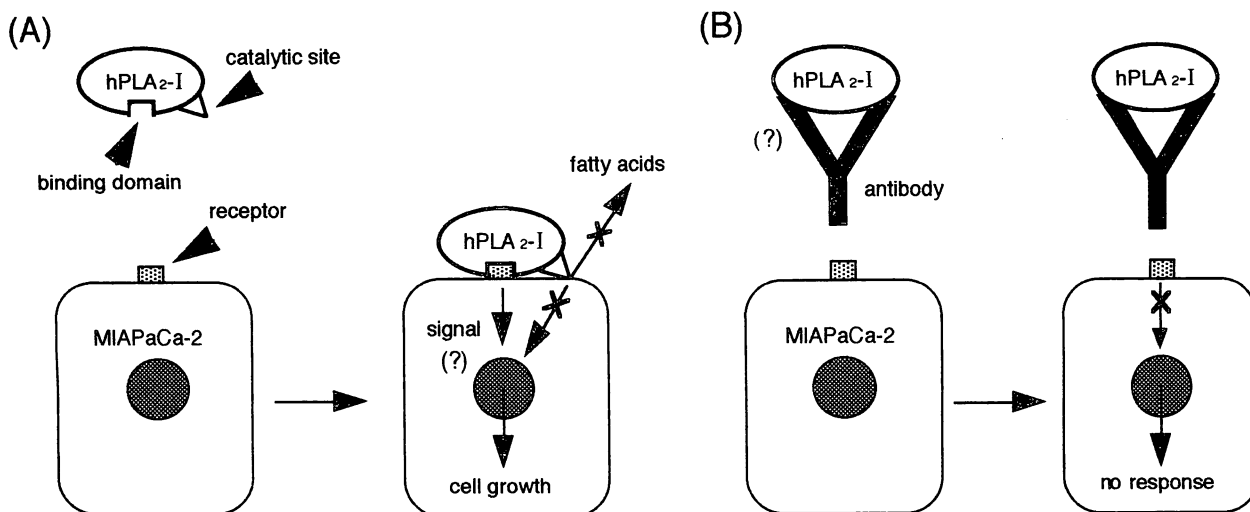


図 17. MIAPaCa-2 における hPLA₂-I の作用動態モデル.

(A) hPLA₂-I には酵素触媒部位と受容体結合部位がそれぞれ独立に存在することが予想され、また、MIAPaCa-2 の生体膜上には hPLA₂-I に対する特異的な受容体が存在する。hPLA₂-I が MIAPaCa-2 の有する特異的受容体に結合すると、hPLA₂-I の直接的な作用による脂肪酸の放出は起こらず（間接的な作用によるアラキドン酸の放出は誘導する）、リゾリン脂質を介さない何か別のシグナルが核へと伝達されて細胞増殖を引き起こす。

(B) 抗 hPLA₂-I 抗体は hPLA₂-I の MIAPaCa-2 増殖促進作用を阻害する。この阻害が抗体による受容体結合部位の閉塞のためか、それとも hPLA₂-I 自身の構造変化に起因するものかは不明である。なお、この抗体は hPLA₂-I の消化酵素活性も阻害する。従って、筆者は後者の説を支持し、(B) 中の hPLA₂-I は (A) 中の hPLA₂-I と形を変えた。

第五節 第二章のまとめ

1. hPLA₂-I が MIAPaCa-2 の持つ特異的受容体に結合する際には、Ca²⁺を要求しなかった。
2. リゾリン脂質には MIAPaCa-2 の増殖促進作用がなかった。
3. 高濃度 (10⁵ g/ml) の Lyso-PC は MIAPaCa-2 に対して強い細胞毒性を示した。
4. MIAPaCa-2 に高濃度の hPLA₂-I を添加しても、生体膜からの著しい遊離脂肪酸は検出されなかった。
5. hPLA₂-I によって MIAPaCa-2 の生体膜からアラキドン酸およびその代謝物の放出が遅延的に誘導された。
6. hPLA₂-I の MIAPaCa-2 増殖促進作用は、アラキドン酸代謝酵素阻害剤によっては抑制されなかった。
7. hPLA₂-I によって誘導される MIAPaCa-2 増殖促進作用は、hPLA₂-I の消化酵素としての活性を介する反応ではなく、hPLA₂-I の特異的受容体を介する応答であると結論した。

【第三章】

ヒト膵液由来 Phospholipase A₂ による膵癌細胞増殖促進作用と 細胞内シグナル伝達機構

第一節 緒言

生命体の最小単位である細胞は、そのすべてが外部からの必要な信号を取り込み応答する。多細胞生物では、それぞれの細胞が適切な信号を取り込み適切な応答を行うが故に、発生という過程を通じてきわめて複雑な個体が作られ、その恒常性が維持される。液性因子や細胞同士の接触を介してやり取りされた信号は、そのほとんどが細胞の生体膜に存在する受容体で感知され、そのシグナルは細胞の中で複雑多岐な経路を介して核に伝わり、遺伝子発現の変化に伴って種々の応答を引き起こす。増殖や分化の開始は最も著しい細胞応答である。酵母のような単細胞生物においても全く同様であり、このような普遍性があるが故に、細胞が信号を感知してから応答に至る細胞内シグナル伝達機構は、多くの疾患の原因や発症機構を知るうえで不可欠なものである。

cAMP (cyclic-adenosine monophosphate) は細胞内シグナル伝達機構を司る分子として最も初期に発見された [Sutherland & Roll, 1958]。すなわち、受容体が細胞外からの信号を感知すると、三量体 GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) の G α サブユニットを介して、細胞内側の生体膜に結合する adenylylase を活性化する。活性化型 adenylylase は、細胞内に存在する ATP を cAMP に変換させ、その cAMP がタンパク質キナーゼ A (PKA) を活性化する。活性化型 PKA は、標的タンパク質のセリン/スレオニン残基をリン酸化し、さらなる標的タンパク質の活性を与え続けていき、やがてその信号は核へ到達する。受容体 \rightarrow cAMP \rightarrow PKA のシグナル経路は、幅広い細胞種が備える細胞内シグナル伝達機構の一つである [Bos *et al.*, 1991; Migeon & Nathanson, 1994]。

また、cAMP 系に次いで注目を集めたのが phosphatidylinositol (PI) の分解系 (PI 応答系) による細胞内シグナル伝達機構である [de Jonge *et al.*, 1995; McNamee *et al.*, 1993]。この系では、受容体が信号を感知すると、三量体 G タンパク質の G α サブユニットを介して、Phospholipase C (PLC: 図 2) を活性化する。活性化型 PLC は、生体膜成分である phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PI(4,5)P₂) を基質とし、それを分解

する [Berridge, 1993; Nishizuka, 1984]。その分解産物である inositol-1,4,5-triphosphate (I_(1,4,5)P₃) が、細胞内 Ca²⁺ 貯蔵部位 (小胞体) の I_(1,4,5)P₃ 受容体に作用して Ca²⁺ を動員し [Berridge, 1993]、もう一つの分解産物である diacylglycerol がタンパク質キナーゼ C (PKC) を活性化する [Nishizuka, 1984]。細胞質内に動員された Ca²⁺ は、様々な代謝系を支配し、また、活性化を受けた PKC は、PKA と同様、種々の標的タンパク質のセリン/スレオニン残基をリン酸化する。

第三の細胞内シグナル伝達機構として、現在、最も注目を集めているのが、タンパク質のチロシン残基キナーゼ系 (チロシンキナーゼ系) である [Janes *et al.*, 1994; Ouwens *et al.*, 1994]。この系もまた、先ず、受容体が細胞外からの信号を感知する。次に、その信号によって刺激を受けた受容体は、自己が持つチロシン残基をリン酸化するが、そのアダプター分子である Grb2 (growth factor receptor bound protein 2) が SH2 (src homology 2) 領域を介してこの自己リン酸化部位に結合し、一方では SH3 領域を介して SOS (son of sevenless protein) と結合する。SOS は癌遺伝子産物として知られる低分子量の G タンパク質である Ras と結合する。さらに Ras はセリン/スレオニンキナーゼである 細胞分裂促進タンパク質 (MAP) キナーゼキナーゼキナーゼ (MAPKKK あるいは Raf) と結合し、活性化した Raf が MAPキナーゼキナーゼ (MAPKK) をリン酸化して活性化させる。さらに、dual-specificity キナーゼとして知られる MAPKK [Pang *et al.*, 1995; Vaillancourt *et al.*, 1994] が、MAPキナーゼ (MAPK) のセリン/スレオニン・チロシン残基をリン酸化して活性化させる。このシグナルは最終的には核内に存在する転写因子へと伝えられるのである。自己リン酸化受容体 → Grb2 → SOS → Ras → Raf → MAPKK → MAPK といった一連のシグナル経路は、チロシンキナーゼ系の細胞内シグナル伝達機構を最も単略化したものであって、実際はより複雑多岐であり [Koyama *et al.*, 1996; Okazaki *et al.*, 1996]、他のシグナル伝達機構との相関も示唆されている。

これまでに挙げた三通りの細胞内シグナル伝達機構の他に、アラキドン酸代謝系によるシグナル伝達機構も普遍的に存在し、増殖あるいはアポトーシスなどの細胞応答に関与していることが知られている [Burkey & Regan, 1995; Korystov, *et al.*, 1996]。生体膜からのアラキドン酸およびその代謝物放出能には、ある種の信号を感知した受容体を介する細胞質内在型 PLA₂ (cPLA₂) の活性化が必須となる [Clark *et al.*, 1995]。細胞質中に遊離されたアラキドン酸は、同じく細胞質中に存在する アラキドン酸代謝酵素によって、プロスタグランジンやロイコトリエンなどのエイコサノイドに変換され、細

胞外に放出される。放出されたエイコサノイドは、さらに信号となって生体膜上にある受容体を刺激し、幾種の生理活性を引き起こすのである [Burkey & Regan, 1995]。

このように、細胞内には様々なシグナル分子を介した伝達経路が幾通りも機能しており、しかも、各経路は互いに独立しているわけではなく、様々な段階で制御しあっている。実際、PI 応答系のシグナル分子である PLC のアイソフォームの一つ PLC γ が SH2 領域を持ち、自己リン酸化受容体と会合して活性化されることが知られている [Anderson *et al.*, 1990]。同じく PI 応答系のシグナル分子である PKC が Raf を標的タンパク質とすることも報告され [Kolch *et al.*, 1993]、PI 応答系とチロシンキナーゼ系とのクロストークが強く示唆されている。また、生体膜からアラキドン酸を遊離させる cPLA₂ が、MAPK によってリン酸化を受けると活性化することが証明された [Gordon *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1993]。この知見は、明らかにアラキドン酸代謝系と MAPK カスケードのクロストークを強く支持するものであり、諸種疾患の発症機構を解明するうえで深い関心を集めている。

第二章において述べたように、hPLA₂-I によって誘導される MIAPaCa-2 増殖促進作用は、hPLA₂-I の消化酵素としての活性を介する反応ではなく、hPLA₂-I の特異的受容体を介する生物学的応答である。それでは、この応答は果たしてどのような細胞内シグナル伝達機構を介しているのだろうか。MIAPaCa-2 の生体膜上に hPLA₂-I の特異的受容体が存在する以上、何らかの細胞内シグナルが発生しているはずである。そこで、第三章では、hPLA₂-I の膵癌細胞増殖促進作用をめぐる細胞内シグナル伝達機構の解明を目的とした。

第二節 MIAPaCa-2 における hPLA₂-I による MAPK カスケードの活性化

cPLA₂ は、その分子中のセリン残基がリン酸化を受けて活性型に変化すると、生体膜からアラキドン酸を特異的に遊離させるトリガー酵素として機能する [Clark *et al.*, 1995]。また、cPLA₂ が細胞分裂促進タンパク質キナーゼ (MAPK) の標的タンパク質であることも報告されている [Gordon *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1993]。筆者は、本研究において、hPLA₂-I 添加により MIAPaCa-2 の生体膜からアラキドン酸およびその代謝物の遊離が誘導されることを見出した (図 15)。もし、hPLA₂-I によるこの生理作用がリン酸化型 cPLA₂ に依存するものであれば、MAPK カスケードとの関連性が考えられる。そこで、MIAPaCa-2 を用い、hPLA₂-I 添加後に MAPK のリン酸化が誘導されるか否か調べた。すなわち、各培養時間処理後の細胞溶解液を Tricine SDS-PAGE にかけて後、抗リン酸化 MAPK 抗体を用いた Western blot 法により検出した。その結果、p44/42 MAPK (ERK1/2) のチロシン残基のリン酸化が短時間 (10 分以内) に誘導されることが明らかとなった (図 18 A)。なお、Western blot 解析した各試料のタンパク質量を統一してあることは、図 18 B に示したように、抗非リン酸化 MAPK 抗体を用いた実験より明らかである。

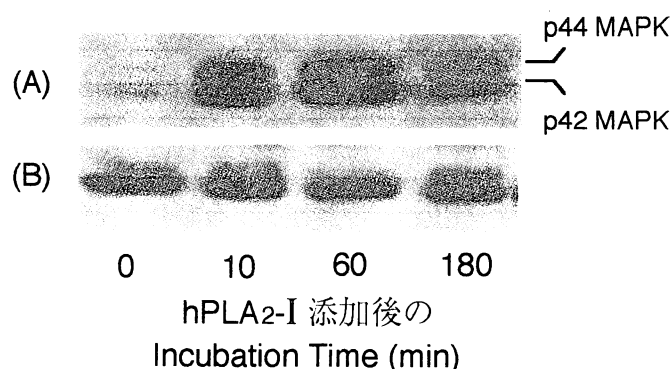


図 18. ヒト膵癌細胞株 MIAPaCa-2 における hPLA₂-I によって誘導される p44/42 MAPK のリン酸化.

- (A) 抗リン酸化 p44/42 MAPK 抗体を用いた Western blot 法による解析.
この抗体は p44/42 MAPK のそれぞれ N 末端から 204 番目のリン酸化されたチロシン残基を特異的に認識する。
(B) 抗非リン酸化 p44/42 MAPK 抗体を用いた Western blot 法による解析.

細胞に送られる信号は、時にストレスとして作用し、生理的・病的応答を促進する。ストレスを受けた細胞は、瞬時にその情報を整理し、核へ伝達することで、ストレ

スに対して防備しなければならない。場合によっては、ストレスによるダメージが自己の分裂増殖により娘細胞に受け継がれるのを防ぎ、ひいては個体の死を防ぐために積極的にアポトーシスを選ぶ必要がある。ストレスという、多様かつ漠然としたイメージの信号が、細胞の中でどのようにして生化学的シグナルに変換されるのかは、未だ不明な点が多い。しかしながら、最近、新規の MAPK ファミリーが発見され、それらがストレスならびにアポトーシスのシグナル伝達経路として重要な機能を果たしていることが明らかとなった [Han *et al.*, 1995; Verheij *et al.*, 1996]。MAPK スーパーファミリーに属する p38 MAPK もその例外ではなく、様々なストレスによって活性化され、アポトーシスを誘導していることが示唆されている [Xia *et al.*, 1995]。そこで、本研究においても、hPLA₂-I 添加後に p38 MAPK のリン酸化が誘導されるか否か調べた。p38 MAPK のチロシンリン酸化は、過酸化水素 (H₂O₂; 0.03%) を添加すると誘導されたが (図 19 C)、hPLA₂-I を添加してもそのリン酸化は全く誘導されなかった (図 19 A)。hPLA₂-I によって p44/42 MAPK が活性化し、p38 MAPK が活性化しないことから、hPLA₂-I といわゆる“古典的な” MAPK カスケードとのクロストークが示唆された。なお、本研究において用いた MIAPaCa-2 は、H₂O₂ によって p38 MAPK の活性化は起こったが、それによるアポトーシスの誘導は起こらなかった (図 1)。

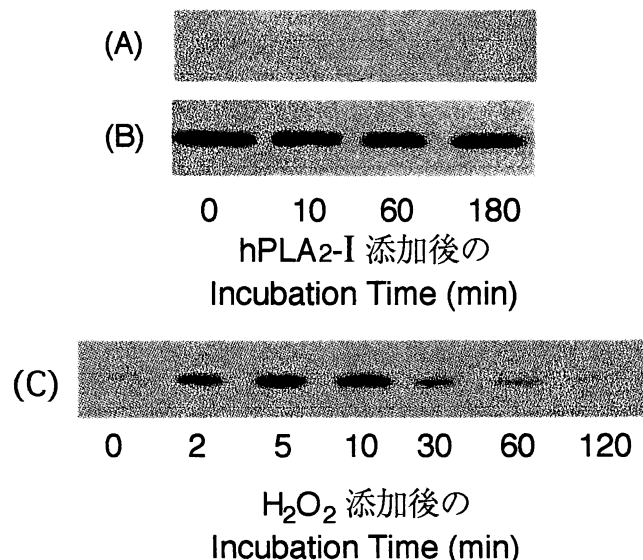


図 19. ヒト膵癌細胞株 MIAPaCa-2 における p38 MAPK のリン酸化。
(A) 抗リン酸化 p38 MAPK 抗体を用いた Western blot 法による解析。
この抗体は p38 MAPK の N 末端から 182 番目のリン酸化されたチロシン残基を特異的に認識する。
(B) 抗非リン酸化 p38 MAPK 抗体を用いた Western blot 法による解析。
(C) H₂O₂ 処理後の MIAPaCa-2 における p38 MAPK のリン酸化。

リン酸化が誘導された p44/42 MAPK が核に移行することはよく知られている [Lenormand *et al.*, 1993]。本研究においても、hPLA₂-I によってリン酸化された p44/42 MAPK が核に移行するか否か調べた。その結果、hPLA₂-I によってリン酸化が誘導された p44/42 MAPK が、リン酸化されたまま、15 分以内に核へ移行することを免疫染色法により確認した (図 20 B)。なお、図 20 の A は、無処理細胞を免疫染色したものである。

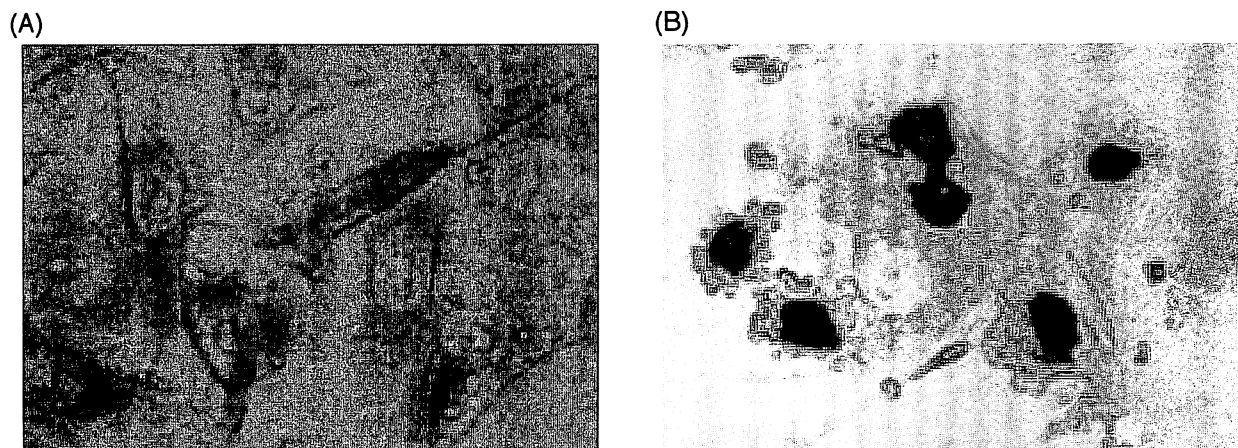


図 20. ヒト膵癌細胞株 MIA PaCa-2 における hPLA₂-I によって誘導される p44/42 MAPK のリン酸化および核への移行. (A) 無処理細胞. (B) hPLA₂-I 処理 15 分後の細胞. (X 1700)

次に、p44/42 MAPK を標的タンパク質とし、細胞質内に存在する p44/42 MAPK あるいは ERK1/2 キナーゼ (MEK1/2 あるいは MAPKK) のリン酸化の動態を上記と同様な方法で検討した。その結果、少なくとも hPLA₂-I 添加後 5 分以内に MEK1/2 のセリン残基のリン酸化が促進されることが明らかとなった (図 21 A)。

さらに、hPLA₂-I によって誘導されたチロシンリン酸化型 p44/42 MAPK の標的タンパク質を調べるため、hPLA₂-I 添加後にいずれの転写因子のリン酸化が誘導されるのかを検討した。その結果、少なくとも ATF-2 のスレオニン残基のリン酸化が誘導されることが明らかとなった (図 22 A)。なお、ATF-2 タンパク質は細胞周期を分裂期へと導くのに役立つ転写因子として知られている他、ロイシンジッパー構造 (B-Zip 構造) を持ち、他の転写因子あるいは自分自身と二量体を形成して機能することが知られている [de Cesare *et al.*, 1995; Livingstone *et al.*, 1995]。しかしながら、c-Jun (図 22 C) あるいは Elk1 (data not shown) などの転写因子のリン酸化は誘導されなかったことから、hPLA₂-I の添加により、ATF-2 が少なくともこれらの転写因子と結合して、ヘテロ二量

体を形成することはないことが示唆された。

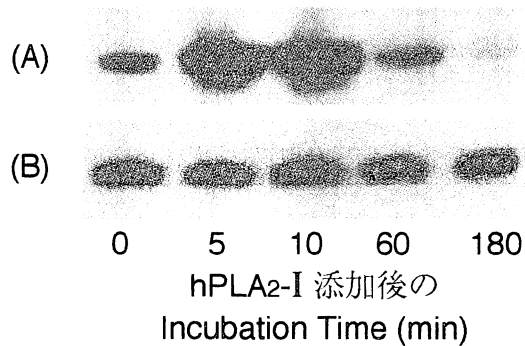


図 21. ヒト臍癌細胞株 MIAPaCa-2 における hPLA₂-I によって誘導される MEK 1/2 のリン酸化.

(A) 抗リン酸化 MEK 1/2 抗体を用いた Western blot 法による解析.

この抗体は MEK 1/2 のそれぞれ N 末端から 217 番目および 221 番目のリン酸化されたセリン残基を特異的に認識する.

(B) 抗非リン酸化 MEK 1/2 抗体を用いた Western blot 法による解析.

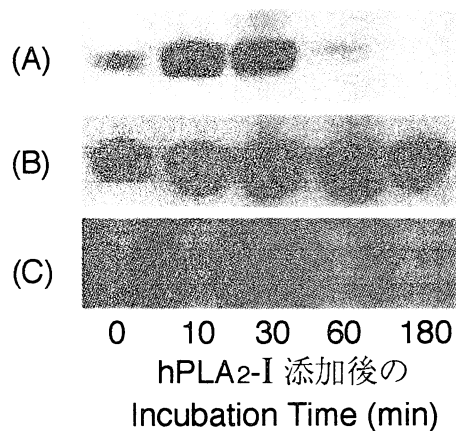


図 22. ヒト臍癌細胞株 MIAPaCa-2 における hPLA₂-I によって誘導される転写因子のリン酸化.

(A) 抗リン酸化 ATF-2 抗体を用いた Western blot 法による解析.

この抗体は ATF-2 の N 末端から 71 番目のリン酸化されたスレオニン残基を特異的に認識する.

(B) 抗非リン酸化 ATF-2 抗体を用いた Western blot 法による解析.

(C) 抗リン酸化 c-Jun 抗体を用いた Western blot 法による解析.

この抗体は c-Jun の N 末端から 63 番目のリン酸化されたセリン残基を特異的に認識する.

第三節 MAPK カスケードを介した hPLA₂-I の MIAPaCa-2 増殖促進作用

筆者は、hPLA₂-I 添加によって MEK1/2、p44/42 MAPK および ATF-2 の三種のタンパク質のリン酸化が誘導されることを明らかにした。しかしながら、これらのシグナル分子の活性化が連続した反応によるものかは、依然、疑問に残る。そこで、MEK1/2 の特異的リン酸化阻害剤である PD98059 (2'-amino-3'-methoxyflavone) [Pang *et al.*, 1995] を用いて、MIAPaCa-2 を16 時間前処理後、MEK1/2、p44/42 MAPK および ATF-2 のリン酸化の有無を調べた。その結果、これら全てのタンパク質において、hPLA₂-I によるリン酸化は阻害された (図 23 A-C)。なお、このリン酸化阻害が PD98059 前処理による細胞死のための代謝系崩壊によるものではないことは、PD98059 前処理後の細胞生存率に変動がないこと (図 23 D) より明らかである。以上のことから、hPLA₂-I によって誘導された MEK1/2、p44/42 MAPK および ATF-2 のリン酸化は短時間におこる連続した反応系であることが示唆された。

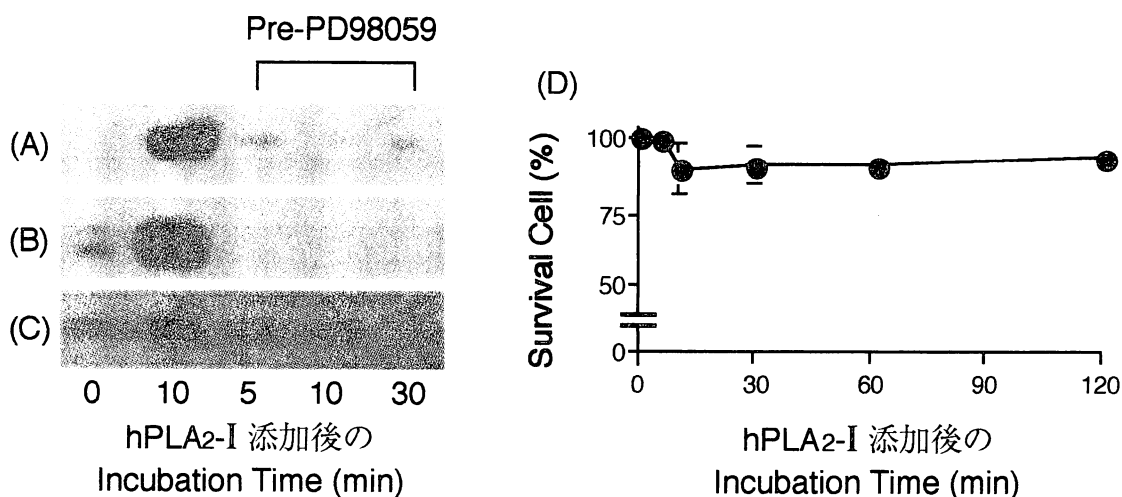


図 23. PD98059 (50 μ M) 前処理による MEK1/2、p44/42 MAPK、ATF-2 のリン酸化および細胞生存率に対する影響.

- (A) 抗リン酸化 MEK 1/2 抗体を用いた Western blot 法による解析.
- (B) 抗リン酸化 p44/42 MAPK 抗体を用いた Western blot 法による解析.
- (C) 抗リン酸化 ATF-2 抗体を用いた Western blot 法による解析.
- (D) PD98059 (50 μ M) 前処理による細胞生存率.

そこで、筆者は、PD98059 が与える hPLA₂-I の MIAPaCa-2 増殖促進作用への影響を調べた。Cell Counting Kit (Doughindo) を用いて検討した結果、PD98059 を様々な濃度 (1 ~ 50 μ M) で前処理すると濃度依存的に増殖促進効果が低下することがわかつ

た (図 24)。従って、これまでの実験結果より、hPLA₂-I の MIAPaCa-2 増殖促進作用が MEK1/2 → p44/42 MAPK → ATF-2 といった連続的リン酸化反応系を介したものであること (図 25) が示唆された。

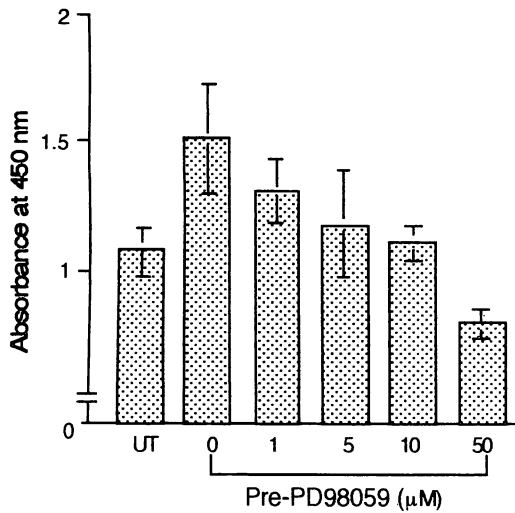


図 24. PD98059 前処理による hPLA₂-I 添加 48 時間後のヒト臍癌細胞株 MIAPaCa-2 の増殖効果. UT: untreated

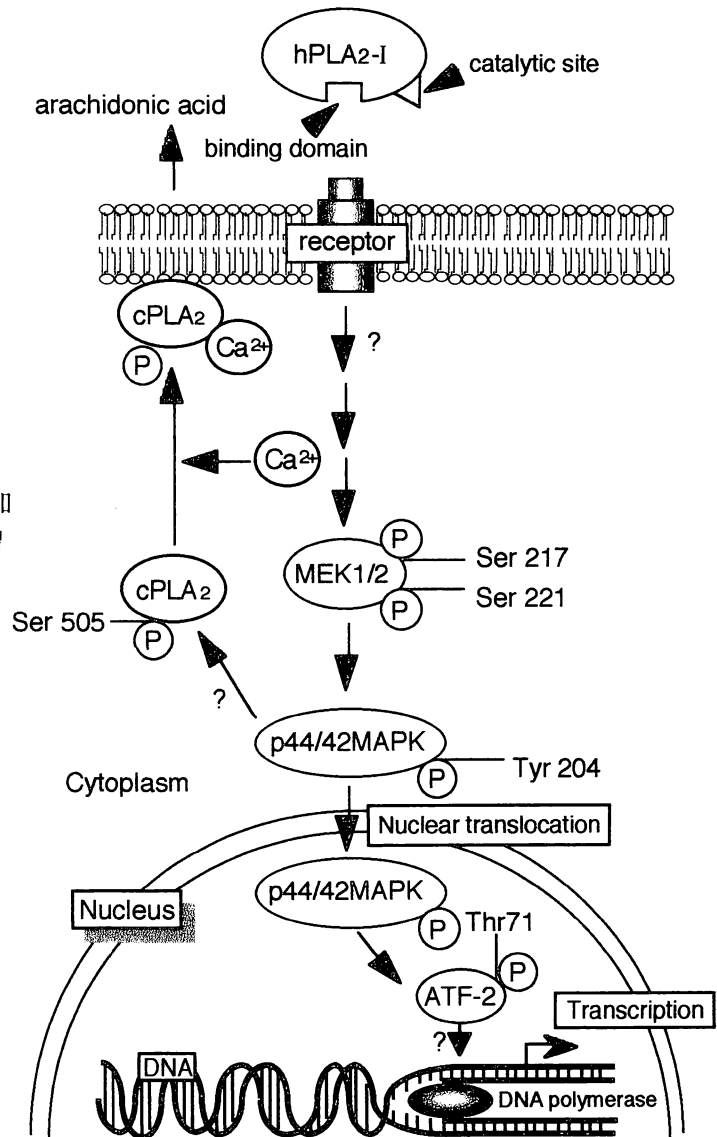


図 25. 予想されるヒト臍癌細胞株 MIAPaCa-2 における hPLA₂-I の増殖促進作用をめぐる細胞内シグナル伝達経路.

第四節 第三章のまとめ

1. MIAPaCa-2 において hPLA₂-I の添加により、MEK1/2、p44/42 MAPK および ATF-2 のリン酸化が誘導された。
2. hPLA₂-I によって誘導された MEK1/2、p44/42 MAPK および ATF-2 のリン酸化は短時間におこる連続した反応系であった。
3. hPLA₂-I の MIAPaCa-2 増殖促進作用が、MEK1/2 → p44/42 MAPK → ATF-2 の連続リン酸化反応系を介した細胞応答であることを示唆した。

【終章】

総括

急性膵炎と hPLA₂-I の相関性を考えるうえで、これまでに数多くの臨床医あるいは研究者によって、血中の hPLA₂-I 量が調べられてきた [Doizaki & Zieve, 1966; Hatao, 1969; Nishijima *et al.*, 1983; Schröder *et al.*, 1980; Zieve & Vogel, 1961]。その結果、急性膵炎の患者では、その血中における hPLA₂-I 量が上昇することがわかってきた。また、急性膵炎が膵臓癌の出現に先だって発症したり、それと同時に発症したり、あるいは膵臓癌の出現後に引き続いて発症したりすることがある [Gambill, 1970]。なかでも、急性膵炎が膵臓癌によって二次的に発症することが最も多い [Gambill, 1970]。膵臓癌の予後はそれ自体悲観的であるのに加えて、急性膵炎の合併によって一層生命が脅かされる。このように急性膵炎と膵臓癌が合併しやすいことに気付きながら、これまで、膵臓癌の進展（増殖）と急性膵炎の相関性は注目されなかった。それは、急性膵炎の発症と進展に密接に関わる hPLA₂-I が、消化酵素としてのみ機能する分子であるという考え方に支配されていたため、膵臓癌の進展（増殖）に hPLA₂-I が関与するという考え方を受け入れる余地がなかったと思われる。

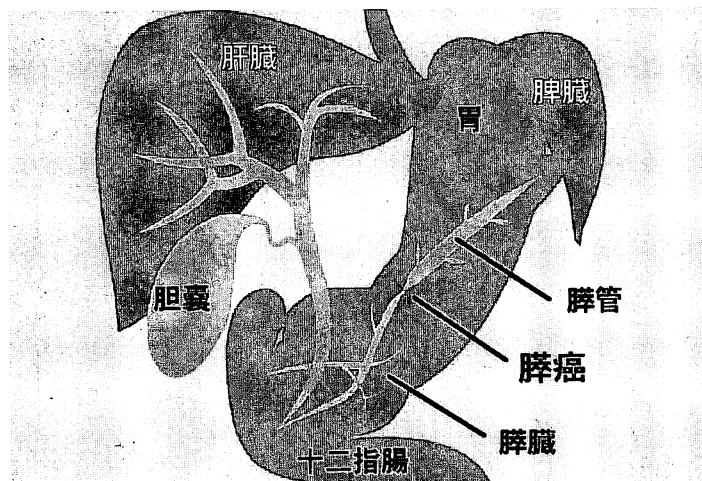


図 26. 膵臓癌の発生部位. 膵臓癌は主に膵管内に発生するので膵腺房細胞から膵管内へ分泌される hPLA₂-I に常に接触する環境下にある。また、この膵臓癌が原因で、膵液の流出障害が生じやすく、急性膵炎の合併が起こる。

筆者は、膵臓癌が消化器系癌の中でも特に悪性度が高く、予後の不良な癌である要因として、『膵管に生じた膵臓癌が原因で、膵液が流出障害を起こし、その結果として、

膵液中に存在する hPLA₂-I が多量にたまり、それが更なる膵臓癌の増殖を促すのではないか (図 26)』という考えを持ってきた。本研究は、まさに、この仮説を強く裏付ける実験結果を与えた。本論文中において、至適濃度の hPLA₂-I により膵癌細胞が増殖すると考察したが、この濃度は急性膵炎患者の血中において十分観察される濃度である [Eskola *et al.*, 1983; Nishijima *et al.*, 1983; Santavuori *et al.*, 1991]。よって、急性膵炎の進展過程において、膵臓癌もまた進展能 (増殖能) が一層高まると言えよう。

hPLA₂-I には膵癌細胞の増殖促進作用以外に、アラキドン酸およびその代謝物遊離の誘導作用を同時に備えていることも明らかとなった。アラキドン酸およびその代謝物は、言うまでもなく、各種炎症疾患に関わるエイコサノイドである。このことは膵臓癌の増殖とその周辺領域の炎症性疾患の発症、すなわち、(急性)膵炎の発症とに有意な相関性があることを示すものであり、今後の膵臓癌における治療診断の上で、重要な示唆を与えるものと思われる。

さらに、筆者は、hPLA₂-I の膵癌細胞増殖作用が本来の酵素触媒反応とは異なる別の生理作用であることを証明した。これまでに、酵素を信号としてそれを感知する受容体もしくは生体膜上の結合タンパク質はいくつか知られていたが、それらのほとんどはその結合後の酵素活性が機能的に重要なものであった。ある場合には、その酵素活性の発現の場を規定することが重要であり [Maruyama & Majerus, 1985; Ploug *et al.*, 1991]、また、別の場合には受容体そのものが、信号となる酵素により切断されることが重要な場合も存在する [McNamara *et al.*, 1993; Vu *et al.*, 1991]。もし、hPLA₂-I の酵素反応部位が、これまでに知られているようなグリセロリン脂質のグリセロール 2 位の 1 箇所に特定でき、かつ、その酵素反応には Ca²⁺ を必須とするならば、膵癌細胞が持つ hPLA₂-I の特異的受容体の場合には、hPLA₂-I の酵素活性自体は細胞増殖を引き起こすのに重要ではなさそうである。それでは、いったい何故に、本来触媒能を持ったタンパク質を細胞内シグナル伝達のための分子として用いる必要性があったのであろうか？この解答を得るための確立は、今後残された本質的な課題となろう。

また、筆者は、hPLA₂-I の膵癌細胞増殖作用が正常細胞にも普遍的に存在する MAPK カスケードを介していることも証明した。このことは、このカスケードを阻害する物質が、膵臓癌の増殖を抑制するための薬剤として成立しないことを意味している。

以上のことから、消化酵素活性は抑制せず、増殖活性のみを抑制する hPLA₂-I 阻害物質の探索を行うことが、最終的には、膵臓癌の増殖の抑制を目的とした医薬品の開発へとつながる最短かつ最良の道であり、期待されるところであると思われる。

【実験の部】

1. 細胞株

65 歳白人男性の膵癌組織から樹立された、未分化膵腺癌細胞株である MIAPaCa-2 [Madden et al., 1989] を Japanese Cancer Reserch Resources Bank より入手して用いた。この細胞株は単層増殖を示すが、密度が高くなると重層化し、次いで、浮遊化する。また、その形態的特徴は、細胞質に富み、2 ~ 4 個の核小体を認める。

2. 一般的操作

2.1. 細胞培養法

10% 胎児牛血清 (FBS : Gibco) を含むダルベッコ改良イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium ; DMEM : Gibco) を培養液として用い、37℃、5% CO₂ の条件下で培養した。また、培養液には抗生物質であるペニシリン (Gibco) およびストレプトマイシン (Gibco) を、それぞれの最終濃度が 100 units /ml および 100 µg/ml となるように加えた。

血球系の細胞を除く大部分の細胞は、ガラス製、あるいはプラスチック製の培養器の表面に付着して増殖する。MIAPaCa-2 もその例外ではなく、各種実験や継体培養を行うには、先ず培養器から細胞をはがし、分散させる必要がある。付着性細胞は、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどの接着タンパク質を介して基質に結合するため、細胞の分散にはこのような接着タンパク質を効果的に分解するトリプシンが最も一般的に使用される。具体的な操作としては、先ず、MIAPaCa-2 を 37℃、5% CO₂ 条件下の CO₂ インキュベータから取りだし、その培養上清をアスピレータで取り除いた。Phosphate-buffered saline (PBS (-), pH 7.4) を静かに加え、培養器に付着した細胞の表面を十分に洗浄した。その後、0.25% トリプシン/ EDTA 液を 250 ml 細胞培養用フラスコ (Sumilon) に対して約 1 ml、90 mm ディッシュ (Sumilon) に対して約 0.5 ml 加え、それらを軽く動かして細胞表面全体にゆきわたらせた。細胞が培養器からはがれ、分散されたことを光学顕微鏡下で確認後、10% FBS 含有 DMEM に懸濁した。FBS には多量のプロテアーゼ阻害物質が存在するので、消化作用が停止する。懸濁した細胞を 90 x g、3 分間で遠沈させ、上清を除いてから再び 10% FBS 含有 DMEM 培養液に懸濁した。

[0.25% トリプシン液]

トリプシン (Gibco)	0.25%
EDTA・3Na	0.5 mM

PBS (-) (pH 7.4) に溶解し、メンブランフィルター (0.22 μm pore) でろ過滅菌した。

[PBS (-)]

NaCl	4 g
KCl	0.1 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.575 g
KH_2PO_4	0.1 g

蒸留水で 500 ml にした (pH 7.4) 。調製時にろ過滅菌を行った。

2. 2. 血球計算板 (Neubauer 型血球計算板) による細胞数の計測

専用のカバーガラスに息を吹き付けて湿らせた後、血球計算板の上へのせ、指ですらすように押し付けながら密着させる。密着部分に虹のように見えるニュートンリングが形成されているのを確かめる。細胞懸濁液を再度軽く懸濁し、約 20 μl の懸濁液を取り、計算板とカバーガラスの間に静かにしみこませる。最後に、光学顕微鏡の試料台に計算板をのせ、1 mm^2 の区画全体を視野に入れて、カウンターを用いて細胞を計数した。生細胞のみを計数したい場合には、細胞懸濁液を 0.3% トリパンブルー / PBS (-) 液と 1:1 の割合で混合してすぐに計算板へのせ、色素で染色されない細胞を計数した。

2. 3. 吸光度による細胞増殖測定

96 穴プレート (Falcon) において、10% FBS 含有 DMEM 中に、細胞株 (2.5 x 10⁴ cells / 200 μl) を静置し、37°C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。次に、プレート穴から培養上清をアスピレーターで吸い取り、改めて 200 μl の 0.1% FBS 含有 DMEM を加えた。各増殖刺激剤および増殖阻害剤を添加して、目的の培養時間終了後の細胞数を WST-1 を利用した Cell Counting Kit (Dojindo) を用いて吸光度として算出した。Cell Counting Kit の試薬溶液を各プレート穴に 20 μl 加え、よく混和した。37°C、5% CO₂ の条件下で 4 時間反応させ、96 穴用プレートリーダー (Toyosokki) で

培養上清の吸光度を測定した。測定波長は 450 nm とした。

[Cell Counting Kitの内容]

試薬A: WST-1 (16.3 mg, 終濃度 5 mM)

HEPES (23.8 mg, 終濃度 20 mM, pH 7.4)

溶液B: 1-Methoxy PMS (0.2 nM, 5 ml)

用時溶解、メンブランフィルター (0.22 μ m pore) を用いてろ過後使用した。

2. 4. タンパク質の定量法

タンパク質の定量法は Protein Assay Kit (Bio-Rad Labs.) を用いて行った。この方法はタンパク質と色素が結合すると、酸性溶液中で色調変化を起こすことを利用したものである。標準タンパク質 (牛血清アルブミン) 溶液及び被検試料溶液 60 μ l に、5 倍希釈した色素溶液 3 ml を加え、よく混和した。約 15 分室温放置後、595 nm における吸収を測定することにより検量線を作成した。この検量線を用いて被検試料のタンパク質濃度を算出した。

2. 5. Tricine SDS-ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) 電気泳動 [Laemmli, 1970]

スラブゲル用泳動板はエタノールで洗浄した。目的とする濃度の分離用アクリルアミドゲル溶液を泳動板に注ぎ、蒸留水を重層して固化させた。水層を除去し、蒸留水で洗浄後、同様に濃縮用アクリルアミドゲル溶液を重層し、コームを差し込んだ。ゲルが固化したらコームをはずし、ウェルの部分を泳動バッファーで洗浄した後、泳動装置にセットし、試料溶液を注入した。試料溶液の調整において、試料タンパク質溶液とサンプルバッファーを等量混合した。泳動は室温で行い、色素が濃縮ゲル中は 20 mA 定電流、分離ゲル中は 40 mA 定電流で行った。泳動終了後、ゲルを取り出し、染色液中で 2 ~ 3 時間染色し、次に脱色液を用いて 2 ~ 3 時間穏やかに振盪することによりバックグラウンドを脱色した。また、分子量マーカータンパクとして SDS-PAGE スタンダード Broad (Bio-Rad Labs.) を用いた。

[分離用アクリルアミドゲル溶液]

30% T、3% C 溶液	2.67 ml
ゲルバッファー	2 ml
20% グリセロール	3.33 ml
	<hr/>
	8 ml

[濃縮用アクリルアミドゲル溶液]

30% T、3% C 溶液	0.4 ml
ゲルバッファー	0.8 ml
H ₂ O	1.8 ml
	<hr/>
	3 ml

ゲルには 10 ml あたり 0.01 g の過硫酸アンモニウムと 5 μ l の TEMED を加えた。

[アクリルアミド・ビスアクリルアミド混合液]

30% T、3% C 溶液

アクリルアミド	30.0 g
BIS アクリルアミド	0.8 g

蒸留水で 100 ml にした。

[ゲルバッファー]

トリズマベース	3.0 M
SDS	0.3%
pH 8.45 とした。	

[サンプルバッファー]

SDS	8% (W/V)
グリセロール	24% (W/V)
トリズマベース	200 mM
2-メルカプトエタノール	4% (V/V)
ブロモフェノールブルー	0.04% (W/V)
pH 6.8 とした。	

[陽極バッファー]

トリズマベース	0.2 M
pH 8.9 とした。	

[陰極バッファー]

トリズマベース	0.1 M
トリシン	0.1 M
SDS	0.1%
pH調整は行わなかった。	

[染色液]

クーマシーブリリアントブルーR250	2.5 g
エタノール	80 ml
酢酸	100 ml
蒸留水	450 ml
<hr/>	
	1000 ml

[脱色液]

エタノール	250 ml
酢酸	80 ml
蒸留水	650 ml
<hr/>	
	980 ml

2.6. DNA の単離精製

エッペンドルフチューブに 5×10^5 cells の MIA PaCa-2 を集め、PBS (-) で2回洗浄後、200 μ l の TE buffer を加え軽く攪拌した。そこに、10% SDS を20 μ l 加え、よく攪拌して細胞が溶解したことを確認した後、5M NaClO₄ を 20 μ l 加え、さらに攪拌した。この溶液の等量の Phenol/Chloroform 溶液を加え激しく攪拌した後、15,000 x g、10 分間、4℃で遠心した。上層の水層を新しいエッペンドルフチューブに移し、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウムと 2 倍量の 100% エタノールを順次加えて、-20℃、10 分間処理した。その後、5,000 x g、3 分間遠心し、沈殿物を 70% エタノールで洗浄した。

70% エタノールを除き、よく乾燥させた後、再び 200 μ l の TE buffer を加え軽く攪拌した。1/10 量の RNase (10 mg/ml) を加え、37°C、10 分間処理した。処理後、この溶液の等量の Phenol/Chloroform 溶液を加え激しく攪拌した後、15,000 x g、10 分間、4°C で遠心した。上層の水層を新しい エッペンドルフチューブに移し、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム、さらに 2 倍量の 100% エタノールを加えて、-20°C、10 分間処理した。その後、5,000 x g、3 分間遠心し、沈殿物を 70% エタノールで洗浄した。70% エタノールを除き、よく乾燥させた後、適当量の TE buffer を加え、それを単離精製 DNA 溶液とした。

[TE buffer]

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA · 2Na (pH 8.0)	1 mM

[Phenol/Chloroform 溶液]

Phenol	5 g
Chloroform	5 ml
8-Hydroxyquinoline	5 mg

上記の混合物を、1/2 量の 1M Tris-HCl/Phenol 5 g で平衡化した後、1/2 量の 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化した。

2.7. アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル (Takara) と TAE buffer を電子レンジにて加熱溶解した後、60°C まで冷却した。Ethidium bromide を 0.5 mg/ml になるように加え、ゲル板にアガロースを注ぎ、試料注入用のスロットを作るためのコームをはめて室温で固めた。ゲルが十分に固まったところでコームを抜き、サブマリン型泳動槽に装着した。泳動する DNA サンプル 1 に対して 1/6 量の色素液を混合し、ゲルのスロットにその混合液を注入した。定電圧 (100 V) により電気泳動し、泳動後、波長 360 nm の紫外線照射により DNA を検出した。

[TAE buffer]

Tris-acetate (pH 8.0)	40 mM
EDTA · 2Na (pH 8.0)	1 mM

[色素液]

Sucrose or Glycerol	50% (w/v)
Bromophenol blue (BPB)	0.5% (w/v)

3. 第一章の実験

3.1. hPLA₂-I の単離精製 [Nishijima *et al.*, 1983]

広島大学付属病院第 1 および第 2 外科にて膵頭十二指腸切除、または膵尾部切除を施行され、術後膵管ドレナージを挿入されている患者の膵液を採取し、pH 5.0、-80℃で保存した。そのヒト膵液を解凍およびろ過した後、透析膜（ペクトラ/ポア 7 M.W. 10000 : Funakoshi）に入れ、約 50 倍量の 5 mM sodium acetate 溶液（pH 5.0）で透析した。透析開始後 2 時間で透析外液を全量交換し、引き続き、スターラーでよく攪拌しながら、約 12 時間透析を行った。透析後のヒト膵液を凍結乾燥させ、その凍結乾燥サンプルを少量の 2M NaCl を含む 50 mM sodium acetate 溶液（pH 5.0）に溶かした。さらに、そのサンプルを 60℃、5 分恒温槽で湯浴させ、12,000 x g、30 分、4℃で遠心した。遠心後、その上清をサンプルとして採集した。そのサンプルを 2M NaCl を含む 50 mM sodium acetate 溶液（pH 5.0）で予め平衡化した Octyl-Sepharose CL-4B（Pharmacia）に添着した。グラジエントメーカーを用いて、溶出液である 50 mM sodium acetate 溶液（pH 5.0）の塩濃度勾配（2 M NaCl ~ 0 M NaCl）を作成し、最終的に、10 ml ずつの分画としてサンプルを溶出させた。UVモニターで測定したタンパク質の存在する分画を、シオノリア膵 PLA₂ キット（Shionogi）を用いて hPLA₂-I 量を測定し、hPLA₂-I を含む分画を確認した。得られた分画を 10 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate（MES: pH 6.0）で上記の方法により透析した。透析後、凍結乾燥させ、その凍結乾燥サンプルを少量の 5 mM sodium acetate 溶液（pH 5.0）に溶かし、同溶液で予め平衡化した CM-Sepharose CL-6B（Pharmacia）に添着した。グラジエントメーカーを用いて溶出液である 5 mM sodium acetate 溶液（pH 5.0）の塩濃度勾配（0 mM NaCl ~ 500 mM NaCl）を作成し、上記と同様の方法でサンプルを溶出および hPLA₂-I 量の測定を行った。hPLA₂-I を含む分画を 10 mM MES（pH 6.0）で透析後、凍結乾燥させたサンプルを 720 μg / ml（50 μM）となるように、50 mM Tris-HCl（pH 6.8）に溶解し、精製品とした。

3. 2. hPLA₂-I 量の測定法

hPLA₂-I 放射免疫測定用キット（シオノリア藤 PLA₂: Shionogi）を用いて定量した。本キットは hPLA₂-I に対する、マウスモノクローナル抗体を用いた固相化一抗体ラジオイムノアッセイ（RIA）法により定量測定する方法である。また、本キットは、反応時間が 2 時間 30 分と短時間であり、1 日で測定結果が得られ、必要な試薬がすべてキット中に含まれている利点を持つ他、本キット中のマウスモノクローナル抗体が、各種動物血清、膵酵素、ホルモンおよび薬剤との交差反応を認めず特異性が高い、などといった特徴を持つ。

3. 3. hPLA₂-I の Western blot 法およびアミノ酸配列の解析

3. 3. 1. Western blot 法

1. 5. の方法で Tricine SDS-PAGE にかけた後、転写緩衝液にニトロセルロース膜（Schleicher and Schuell）、SDS ゲル、3MM 紙、ファイバーを入れ、約 30 分放置し平衡化した。平衡化終了後、ゲルホルダーカセットに挟み、泳動槽を転写緩衝液で満たした後、150 mA 定電流で約 1 時間泳動した。

3. 3. 2. Vectastain ABC - Elite kit を用いての抗原検出

ブロッキング終了後のニトロセルロース膜を TTBS で 30 分間洗浄した後、100 倍希釈した一次抗体溶液に浸して 30 分間振盪させた。次に TTBS を 3 ~ 4 回交換しながら、計 15 分間洗浄した。引き続き、二次抗体溶液に浸して 30 分間振盪させた後、TTBS で洗浄した。更に、ABC 試薬溶液で 30 分間振盪させ、同様に TTBS で洗浄した。基質溶液で発色後、蒸留水で 2 回洗浄した。ニトロセルロース膜は風乾させて保存した。

[一次抗体]

anti-human PLA₂-I antibody from mouse - mouse hybrid serum
(Boehringer-Mannheim)

[二次抗体]

biotinated anti - mouse IgG from Goat (5 µg/ml: MBL)

[転写緩衝液]

トリズマベース	25 mM
グリシン	192 mM
メタノール	20%

pH 調整は行わず、4℃ で保存した。

[TTBS]

Tween 20	0.1%
トリズマベース	100 mM
NaCl	0.9%

pH 7.5 に調整した。

[抗体希釈用 TTBS]

TTBS に 1.5% (V/V) となるように Normal Goat Serum を加え、4℃ で保存した。

[基質溶液]

10 mM Tris ·HCl (pH7.5)	10 ml
40 mg/ml Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	200 µl
80 mg/ml NiCl ₂	50 µl
3% 過酸化水素水	30 µl

[ABC 溶液]

試薬 A (アジピン DH)	2 drops
試薬 B (ビオチン化 HRP)	2 drops
TTBS	10 ml

3. 3. 4. エドマン分解によるアミノ酸配列の解析

50 mM Tris-HCl (pH 6.8) に溶解した精製 hPLA₂-I 溶液 (50 µM) を高速液体クロマトグラフィーにより溶液置換した。100 µl の hPLA₂-I /CH₃CN をアミノ酸シーケンサー (PSQ-2: Shimazu) に添着し、エドマン分解法により N 末端から 20 アミノ酸残基を決定した。

3. 4. hPLA₂-I の酵素活性測定法3. 4. 1. 非ラジオアイソトープによる hPLA₂-I の酵素活性測定法

反応溶液 I に、適当量の酵素溶液を加え、37℃、10 分間処理した後、反応溶液 I と等量の 20 mM *N*-Ethylmaleimide を加えた。さらに、反応溶液 I と等量の反応溶液 II を加え 37℃、5 分間処理した後、反応溶液 I と等量の 2% SDS と反応溶液 I の 1/5 容量の 0.5 M EDTA を順次加え反応を停止してから、最後に、反応液を 555 nm の吸光度で測定した。測定した吸光度を次式に代入することにより、hPLA₂-I の酵素活性を求めた。この測定法はすでに精製された hPLA₂-I の酵素活性を測定するのに適している。

$$\text{hPLA}_2\text{-I activity (mmol/min/mg)} = \text{DA} \cdot x / 12.0 \cdot 0.5 \cdot y \cdot t \cdot p$$

[DA, absorbance at 555 nm of reaction mixture; x, final volume of reaction mixture (ml); 12.0, milimolar extinction coefficient quinoneimine dye (cm²/mmol); 0.5, the multiplier derived from the fact that 2 moles of H₂O₂ produces 1.0 mole of quinoneimine dye; y, volume of enzyme solution (ml); t, reaction time (min); p, concentration of total protein in the enzyme solution (mg/ml)].

[反応溶液 I]

Tris -HCl (pH7.5)	80 mM
phosphatidylcholin	2 mM
CaCl ₂	50 mM
ATP	4 mM
Acyl-CoA synthetase	0.25 unit
Triton X-100	0.2%

[反応溶液 II]

PIPES (pH 7.3)	20 mM
4-Aminoantipyrine	0.03%
TOOS*	0.03%
Peroxidase	1.125 units
Acyl-CoA oxidase	5 units
ATP	4mM
Triton X-100	0.2%

TOOS*: *N*-Ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-*m*-toluidine, Sodium salt

3. 4. 2. ラジオアイソトープを用いた hPLA₂-I の酵素活性測定法

反応溶液 I に、適当量の酵素溶液および最終濃度が 1 mM となるような CaCl₂ 溶液を加え、37°C、10 分間処理した後、反応溶液 I の 5 倍量の反応溶液 II を加えた。この混合溶液を 60°C、1 分間処理し、反応を停止した。これを室温に戻した後、さらに、この混合溶液に 0.4 倍量の蒸留水と 0.5 倍量のヘプタンを加え、よく攪拌した後、900 x g で 10 分間遠心した。上層のヘプタン層を別の容器に移し、倍量のヘプタンをさらに加えた。適当量のシリカゲルを加え、よく攪拌した後、900 x g で 10 分間遠心した。上清を 5 倍量のシンチレーション液 (ACS II, Amersham) を予め入れておいたバイアル瓶に加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloka) で放射活性を測定した。この測定法は粗精製時の hPLA₂-I 酵素活性を測定するのに適している。

[反応溶液 I]

¹⁴C-phosphatidylcholin (DuPont) ,
 (L- α -dipalmitoyl-[2-palmitoyl-1-¹⁴C]-)
 $5 \times 10^5 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}/\mu\text{l}$
 Triton X-100 0.5%

[反応溶液 II]

Dole の試薬 [Dole & Meinertz, 1960]
 (イソプロパノール : n-ヘプタン : 1 N 硫酸 = 78 : 20 : 2)

3. 5. hPLA₂-I の放射性ヨウ素 [¹²⁵I] 標識 [Hunter & Greenwood, 1962]

Na¹²⁵I 溶液 (IMS-30, Amersham, 37 mBq) を 10 μl 分取し、キュリーメーターで含量を確認する。0.5 M PB 100 μl 、hPLA₂-I 溶液 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 16 μl を分取し、攪拌する (反応終了まで攪拌し続ける)。クロラミン T 溶液 20 μl を添加し、45 秒後にピロ亜硫酸ナトリウム 50 μl を添加する。その後、ヨウ化カリウム溶液 10 μl 、牛血清アルブミン (BSA; Albumin, Bovine Fraction V: Sigma) 溶液 10 μl を添加する。フラクションコレクターに RIA チューブを 40 本並べ、5 ~ 20 本目に BSA 溶液を 100 μl ずつ添加しておく。Sephadex G-25 (fine, Pharmacia) column (ϕ 1.0 cm x 25 cm) に反応液をかけ、BSA 溶液 200 μl で洗い込む。クロマト溶出液で溶出し、1 ml/フラクシヨ

ンの分画で 40 本溶出する。 [^{125}I]-hPLA₂-I 分画（フラクション 9～11 本目）を分取し、標識物希釈液で 20 ml に希釈する。その 10 μl を γ カウンターで測定し、目的の放射活性に希釈する。

[0.5 M PB]

リン酸二ナトリウム12水塩	7.89 g
リン酸水素二カリウム	368 mg

蒸留水によって50 ml に定容し、pH 7.5 に調整する。

[1% BSA]

BSA (Albumin, Bovine Fraction V, Sigma) 100 mg
0.1 M PB によって 10 ml に定容する。

[0.25% クロラミン T 溶液]

クロラミン T (nacalai tesque)	20 mg
--------------------------	-------

0.5 M PB によって 10 ml に定容する（用時調製）。

[クロマト溶出液]

リン酸二ナトリウム12水塩	14.33 g
リン酸水素二カリウム	1.36 mg
アジ化ナトリウム	50 mg

蒸留水によって500 ml に定容し、pH 7.5 に調整する。

[標識物希釈液]

塩化ナトリウム	9 g
リン酸二ナトリウム12水塩	2.73 g
リン酸水素二カリウム	324 mg
エデト酸ナトリウム	1.12 g
アジ化ナトリウム	50 mg
黄色 4 号	218 mg
BSA	2 g

蒸留水によって1000 ml に定容し、pH 7.4 に調整する。

3. 6. Scatchard 解析

12 穴プレート (Falcon) に MIAPaCa-2 を 1×10^6 cells 静置し、6 時間培養する。培養液を除き、0.1% BSA を含む Hanks' solution を各プレート穴に 500 μ l ずつ加え、予め調製しておいた、一定量の [125 I]-hPLA₂-I (2,500 cpm/fmol) と非標識 hPLA₂-I の混合溶液をそれぞれの濃度で添加する。その後、0.1% BSA を含む PBS (-) で 3 回洗浄し、1 M NaOH を各プレート穴に 500 μ l ずつ加え、30 分間室温で静置する。最後に、細胞をポリエチレンチューブ (RIA チューブ) に集め、5,000 x g、10 分間遠心した後、沈殿物の放射活性を γ カウンターで測定した。この値を全結合値とした。このとき、非特異的な結合がどの程度であるか計算するために、過剰量の非標識 hPLA₂-I (500 nM) を添加した場合の放射活性も測定した。この値を非特異的結合値とした。各濃度の全結合値から非特異的結合値を差し引いた値を特異的結合値とした。

次に、1 nM の [125 I]-hPLA₂-I-非標識 hPLA₂-I の混合溶液と様々な濃度の各種分泌型 PLA₂ (阻害物質) を同時に各プレート穴に添加して、上記と同様な方法を用いて、 γ カウンターで放射活性を測定した。この方法は、[125 I]-hPLA₂-I の細胞への結合が阻害物質によってどれほど阻害されるのかを調べるのに適している。この方法によって、各種阻害物質の阻害率と阻害濃度を次式に代入することによって 50% 結合阻害濃度 (IC₅₀ 値) を求めた。

$$IC_{50} \text{ 値} = (50\% - B) \cdot (A' - B') / (A - B) + B'$$

A; 50% 阻害に最も近接した 50% 以上の阻害率 (%) A'; A の時の阻害物質の濃度

B; 50% 阻害に最も近接した 50% 未満の阻害率 (%) B'; B の時の阻害物質の濃度

[Hanks' solution]

NaCl	8 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	0.1 g
KH ₂ PO ₄	0.06 g
MgSO ₄	0.1 g
MgCl ₂	0.1 g
CaCl ₂	0.2 g
glucose	1 g

蒸留水によって 1000 ml に定容し、pH 7.6 に調整する。

4. 第二章の実験

4. 1. 生体膜から放出された脂肪酸の検出

96 穴プレート (Falcon) において、10% FBS 含有 DMEM 中に、細胞株 (2.5×10^4 cells / 200 μ l) を静置し、37°C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。次に、プレート穴から培養上清をアスピレーターで吸い取り、改めて 200 μ l の 0.1% FBS 含有 DMEM を加えた。その後、目的とする濃度の hPLA₂-I を添加し、目的とする時間の培養を 37°C、5% CO₂ の条件下で行った。それ以降の操作は、2. 4. 1. の方法を応用して行った。最終的には、96 穴用プレートリーダー (Toyosokki) で測定し、測定波長は 555 nm とした。なお、コントロール吸光度として各種濃度のパルミチン酸を用いて測定し、検量線を作製した。

4. 2. 生体膜から放出されたアラキドン酸の検出

24 穴プレート (Falcon) において、10% FBS 含有 DMEM 中に、細胞株 (3×10^4 cells / 500 μ l) を静置し、37°C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。培養後、[³H]-arachidonic acid (Moravek Biochemicals, 210 Ci (7.77 TBq) /mmol) を各プレート穴において 0.5 μ Ci/500 μ l となるように加え、さらに、37°C、5% CO₂ の条件下で 20 時間培養して、[³H]-arachidonic acid を MIAPaCa-2 の生体膜に代謝標識した。その後、培養液を 0.1% FBS を含む DMEM に交換し、最終濃度が 50 nM となるように hPLA₂-I を添加した。添加後、目的とする時間の培養を 37°C、5% CO₂ の条件下で行った。培養終了後、培養上清を等量の PBS (-) と混合し、15,000 x g、10 分間遠心した後、その上清を試料とした (試料 A)。一方、細胞も同時に集め、PBS (-) で一回洗浄した後、0.5% Triton X-100 (200 μ l) で可溶化させた (試料 B)。それぞれの試料を別のろ紙 (Advantec, ϕ 70 mm) にしみこませ、乾燥させた後、10 ml のシンチレーション液 (ACS II, Amersham) と共にバイアル瓶に加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloka) で放射活性を測定した。その放射活性を次式に代入して、アラキドン酸放出率 (%) を求めた。

$$\text{アラキドン酸放出率 (\%)} = \frac{\text{試料 A の放射活性}}{\text{試料 A の放射活性} + \text{試料 B の放射活性}}$$

5. 第三章の実験

5. 1. Western blot 法

細胞内シグナル伝達機構の解明には、PhosphoPlus Antibody Kit (New England Biolabs) を利用した Western blot 法を用いて行った。本キットは各種プロテインキナーゼ、あるいは転写因子のリン酸化特異的抗体、非リン酸化特異的抗体、コントロールタンパク質、分子量マーカー、および検出に必要な基質と二次抗体がすべて含まれている。さらに、非常に特異性が高いこと、ラジオアイソトープを用いずに、タンパク質のリン酸化状態を検出できること、といった利点を持つ。

90 mm ディッシュ (Sumilon) に 1×10^7 cells の MIA PaCa-2 を静置し、24 時間、10% FBS を含む DMEM 中で培養した。培養液を除き、PBS (-) で 3 回洗浄した後、12 時間、0.1% FBS を含む DMEM 中で培養した。培養液を除き、PBS (-) で 1 回洗浄した後、再び 0.1% FBS を含む DMEM を加え、hPLA₂-I 添加後の各培養時間の細胞溶解液を 2. 4. の方法に従ってタンパク質定量し、2. 5. に記したように Tricine SDS-PAGE にかき、PhosphoPlus Antibody Kit を用いて 3. 3. 1. に記したように Western blot 解析した。

5. 2. 免疫細胞染色法

12 穴プレート (Falcon) において、10% FBS 含有 DMEM 中に、細胞株 (8×10^5 cells / 500 μ l) を静置し、37°C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。培養液を除き、PBS (-) で 3 回洗浄した後、12 時間、0.1% FBS を含む DMEM 中で培養した。培養液を除き、PBS (-) で 1 回洗浄した後、再び 0.1% FBS を含む DMEM を加え、最終濃度が 50 nM となるように hPLA₂-I を添加した。添加後、目的とする時間の培養を 37°C、5% CO₂ の条件下で行った。培養完了後、培養液を除いて PBS (-) で 3 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド溶液中で、4°C にて 10 分間処理した。PBS (-) で 3 回洗浄し、0.2% Triton X-100/ PBS (-) 溶液で、室温にて 2 分間処理した。PBS (-) で穏やかに 3 回以上洗浄した後、PhosphoPlus MAPK Antibody Kit (New England Biolabs) を利用し、3. 3. 2. の方法によって基質溶液で発色後、蒸留水で 2 回洗浄した。

[4% パラホルムアルデヒド溶液]

Paraformaldehyde, powder (nacalai tesque) 8 g

蒸留水によって100 ml に溶解する。この時、60℃ に暖めながら溶解する。また、1 N NaOH を数滴加え、溶解を促す。完全に溶解したら、その溶解液が室温となるまで冷却し、100 ml の 2 x PBS (-) を加える。この溶液は実験当日に調製する。

6. 試薬

本研究で増殖刺激物質および増殖阻害物質として用いた試薬の入手先を以下に示した。

薬剤名	入手先
indomethacin	Wako
lysophosphatidylcholin	Sigma
lysophosphatidylethanolamine	Sigma
lysophosphatidylglycerol	Sigma
lysophosphatidylinositol	Sigma
nordihydroguaiaretic acid	Sigma
PD98059 (2'-amino-3'-methoxyflavone)	Calbiochem
PLA ₂ from <i>Apis mellifera</i> venom	Sigma
PLA ₂ from <i>Crotalus adamanteus</i> venom	Sigma

【参考文献】

- Ackermann, E. J. and Dennis, E. A. (1995) Mammalian calcium-independent phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta.* **1259**: 125-136.
- Amundson, S. A. and Chen, D. J. (1996) Inverse dose-rate effect for mutation induction by gamma-rays in human lymphoblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* **69**: 555-563.
- Anderson, D., Koch, C. A., Grey, L., Ellis, C., Moran, M. F. and Pawson, T. (1990) Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* **250**: 979-982.
- Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., Oka, S., Teraoka, H. and Matsumoto, K. (1991) Novel proliferative effect of phospholipase A₂ in Swiss 3T3 cells via specific binding site. *J. Biol. Chem.* **266**: 19139-19141.
- Asaoka, Y., Oka, M., Yoshida, K., Sasaki, Y. and Nishizuka, Y. (1996) Role of lysophosphatidylcholine in T-lymphocyte activation: involvement of phospholipase A₂ in signal transduction through protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 6447-6451.
- Balsinde, J. and Dennis, E. A. (1996) Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A₂ enzymes present in P388D1 macrophages. *J. Biol. Chem.* **271**: 6758-6765.
- Bergmann, U., Funatomi, H., Kornmann, M., Beger, H. G. and Korc, M. (1996) Increased expression of insulin receptor substrate-1 in human pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**: 886-890.
- Bergmann, U., Funatomi, H., Yokoyama, M., Beger, H. G. and Korc, M. (1995) Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res.* **55**: 2007-2011.
- Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.
- Bishop, C. J., Rzepczyk, C. M., Stenzel, D. and Anderson, K. (1987) The role of reactive oxygen metabolites in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Cell. Sci.* **87**: 473-481.
- Bos, M. P., van Leeuwen, J.P. and Herrmann-Erlee, M. P. (1991) Modulation of

- responsiveness to cAMP stimulating agonists by phorbol ester in fetal rat osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* **147**: 87-92.
- Brown, D. M. and Phipps, R. P. (1996) Bcl-2 expression inhibits prostaglandin E₂- mediated apoptosis in B cell lymphomas. *J. Immunol.* **157**: 1359-1370.
- Bückler, M., Deller, A., Malfertheiner, P., Kleine, H. O., Wiedeck, H., Uhl, W., Samtner, M, Frieß, H., Nevalainen, T. and Beger, H. (1989) Serum phospholipase A₂ in intensive care patients with peritonitis, multiple injury, and necrotizing pancreatitis. *Klin. Wochenshr.* **67**: 217-221.
- Burkey, T. H. and Regan, J. W. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinase by the human prostaglandin EP_{3A} receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**: 152-158.
- Burno, D. K., Fabian, D.F. and Lefor, A. T. (1996) ICAM-1 increases in vitro adhesion and cytotoxicity in a murine fibrosarcoma. *J. Surg. Res.* **60**: 398-402.
- Carboni, J. M., Yan, N., Cox, A. D., Bustelo, X., Graham, S. M., Lynch, M. J., Weinmann, R., Seizinger, B. R., Der, C. J. and Barbacid, M. (1995) Farnesyltransferase inhibitors are inhibitors of Ras but not R-Ras2/TC21, transformation. *Oncogene* **10**: 1905-1913.
- de Cesare, D., Vallone, D., Caracciolo, A., Sassone, Corsi, P., Nerlov, C. and Verde, P. Heterodimerization of c-Jun with ATF-2 and c-Fos is required for positive and negative regulation of the human urokinase enhancer. *Oncogene* **11**: 365-376.
- Chen, C. Y., Hall, I., Lansing, T. J., Gilmer, T. M., Tlsty, T. D. and Kastan., M. B. (1996) Separate pathways for p53 induction by ionizing radiation and N-(phosphonoacetyl)-L-aspartate. *Cancer Res.* **56**: 3659-3662.
- Clark, J. D., Schievella, A. R., Nalefski, E. A. and Lin, L. L. (1995) Cytosolic phospholipase A₂. *J. Lipid. Mediat. Cell. Signal.* **12**: 83-117.
- Dennis, E. A. (1994) Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **269**: 13057-13060.
- Dole, V. P. and Meinertz, H. (1960) Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* **235**: 2595-2599.
- Doizaki, W. M. and Zieve, L. (1966) Turbidimetric serum phospholipase A activity in acute

- pancreatitis. *J. Lab. Clin. Med.* **67**: 108-115.
- Eskola, J. U., Nevalainen, T. J. and Lovgren, T. N. (1983) Time-resolved fluoroimmunoassay of human pancreatic phospholipase A₂. *Clin. Chem.* **29**: 1777-1780.
- Farr, C. J., Marshall, C. J., Easty, D. J., Wright, N. A., Powell, S. C. and Paraskeva, C. (1988) A study of ras gene mutations in colonic adenomas from familial polyposis coli patients. *Oncogene* **3**: 673-678.
- Figarella, C., Clemente, F. and Guy, O. (1971) A zymogen of phospholipase A₂ in human pancreatic juice. *Biochim. Biophys. Acta* **227**: 213-217.
- Fujino, M., Dosaka-Akita, H., Harada, M., Hiroumi, H., Kinoshita, I., Akie, K. and Kawakami, Y. (1995) Prognostic significance of p53 and ras p21 expression in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **76**: 2457-2463.
- Gambill, E. E. (1970) Pancreatic and ampullary carcinoma: diagnosis and prognosis in relationship to symptoms, physical findings, and elapse of time as observed in 255 patients. *South. Med. J.* **63**: 1119-1122.
- Grataroli, R., de Caro, A., Guy, O., Amic, J. and Figarella, C. (1981) Isolation and properties of phospholipase A₂ from human pancreatic juice. *Biochimie.* **63**: 677-684.
- Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**: 405-413.
- Gordon, R. D., Leighton, I. A., Campbell, D. G., Cohen, P., Creaney, A., Wilton, D. C., Masters, D. J., Ritchie, G. A., and Mott, R., Taylor, I. W., Bundell, K. R., Douglas, L., Morten, J. and Needham, M. (1996) Cloning and expression of cystolic phospholipase A₂ (cPLA₂) and a naturally occurring variant. Phosphorylation of Ser505 of recombinant cPLA₂ by p42 mitogen-activated protein kinase results in an increase in specific activity. *Eur. J. Biochem.* **238**: 690-697.
- de Haas G. H., Postema, N. M., Nieuwenhuizen, W. and van Deenen, L. L.M. (1968) Purification and properties of an anionic zymogen of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta.* **159**: 118-129.
- Han, J., Richter, B., Li, Z., Kravchenko, V. and Ulevitch, R. J. (1995) Molecular cloning of human p38 MAP kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1265**: 224-227.

- Hara, S., Kudo, I., Matsuta, K., Miyamoto, T. and Inoue, K. (1988) Amino acid composition and NH₂-terminal amino acid sequence of human phospholipase A₂ purified from rheumatoid synovial fluid. *J. Biochem.* **104**: 326-328.
- Hatao, M. (1969) On etiology and pathophysiology of acute pancreatitis with special reference to participation of phospholipase A. *Arch. Jap. Chir.* **38**: 76-106.
- Holm, B. A., Keicher, L., Liu, M. Y., Sokolowski, J. and Enhorning, G. (1991) Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J. Appl. Physiol.* **71**: 317-321.
- Huang, T. S., Kuo, M. L., Shew, J. Y., Chou, Y. W. and Yang, W. K. (1996) Distinct p53-mediated G1/S checkpoint responses in two NIH3T3 subclone cells following treatment with DNA-damaging agents. *Oncogene* **13**: 625-632.
- Hunter, W. H. and Greenwood, F. C. (1962) Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**: 495-496.
- Ian, R., Swift, B. S. and Jill, P. S. (1994) Cholecystokinin analog, JMV-180, stimulates growth of human pancreatic cancer. *Dig. Dis. Sci.* **39**: 1007-1013.
- Janes, P. W., Daly, R. J., de Fazio, A. and Sutherland, R. L. (1994) Activation of the Ras signalling pathway in human breast cancer cells overexpressing erbB-2. *Oncogene* **9**: 3601-3608.
- Johnson, L. R. (1981) Effects of gastrointestinal hormones on pancreatic growth. *Cancer* **47**: 1640-1645.
- de Jonge, H. W., van Heugten, H. A. and Lamers, J. M. (1995) Signal transduction by the phosphatidylinositol cycle in myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**: 93-106.
- Kanemasa, T., Hanasaki, K. and Arita, H. (1992) Migration of vascular smooth muscle cells by phospholipase A₂ via specific binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* **1125**: 210-214, 1992.
- Keynes, W. M. (1980) A nonpancreatic source of the proteolytic-enzyme amidase and bacteriology in experimental acute pancreatitis. *Ann. Surg.* **191**: 187.
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. Coviello,

- G. M. Wright, W. E., Weinrich, S. L. and Shay, J. W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-2015.
- Kimura, W., Secknus, R., Fischbach, W. and Mossner, J. (1993) Role of phospholipase A2 in pancreatic acinar cell damage and possibilities of inhibition: studies with isolated rat pancreatic acini. *Pancreas* **8**: 70-79.
- Kishino, J., Tohkin, M. and Arita, H. (1992) Proliferative effect of phospholipase A2 in rat chondrocyte via its specific binding sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**: 1025-1031.
- Kobayashi, T., Consoli, U., Andreeff, M., Shiku, H., Deisseroth, A. B. and Zhang, W. (1995) Activation of p21WAF1/Cip1 expression by a temperature-sensitive mutant of human p53 does not lead to apoptosis. *Oncogene* **11**: 2311-2316.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H. and Finkenzeller, G. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**: 249-252.
- Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Muraoka, M., Onda, A., Okumura, Y., Kishi, N., Iwama, T., Mori, T., Koike, M., Ushio, K., Chiba, M., Nomizu, S., Konishi, F., Utsunomiya, J. and Miyaki, M. (1996) Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterol.* **111**: 519-521.
- Korc, M., Chandrasekar, B., Yamanaka, Y., Friess, H., Buchier, M. and Beger, H.G. (1992) Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J. Clin. Invest.* **90**: 1352-1360.
- Korystov, N. Y., Dobrovinskaya, R. O., Shaposhnikova, V. V. and Eidus, Kh. L. (1996) Role of arachidonic acid metabolism in thymocyte apoptosis after irradiation. *FEBS Lett.* **388**: 238-241.
- Koyama, S., Chen, Y. W., Ikeda, M., Muslin, A. J., Williams, L. T. and Kikuchi, A. (1996) Ras-interacting domain of RGL blocks Ras-dependent signal transduction in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* **380**: 113-117.
- Kramer, R. M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., McGray, P., Chow, E. P., Tizard, R.

- and Pepinsky, R. B. (1989) Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **264**: 5768-5775.
- Kume, N., Cybulsky, M. I. and Gimbrone, M. A. Jr. (1992) Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **90**: 1138-1144.
- Kume, N. and Gimbrone, M. A. Jr. (1994) Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **93**: 907-911.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larson, D. D., Spangler, E. A. and Blackburn, E. H. (1987) Dynamics of telomere length variation in *Tetrahymena thermophila*. *Cell* **50**: 477-483.
- Lawley, P. D. (1994) Historical origins of current concepts of carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* **65**: 17-111.
- Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A. and Pouyssegur, J. (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **122**: 1079-1088.
- Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A. and Davis, R. J. (1993) cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**: 269-278.
- Livingstone, C., Patel, G. and Jones, N. (1995) ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* **14**: 1785-1797.
- Lundin, J., Nordling, S., von Boguslawsky, K., Roberts, P. J. and Haglund, C. (1996) Prognostic value of immunohistochemical expression of p53 in patients with pancreatic cancer. *Oncol.* **53**: 104-111.
- Magee, W. L., Gallai-Hatchard, J., Saunders, H. and Thompson, R. H. S. (1962) The purification and properties of phospholipase A₂ from human pancreas. *Biochem. J.* **83**: 17-25.

- Madden M.E., Heuton, K.M., Huff, J. K. and Starras, M.P. (1989) Comparative analysis of human pancreatic undifferentiated cell line (MIAPaCa-2) to acinar and ductal cells. *Pancreas* **4**: 529-537.
- Maruyama, I. and Majerus, P. W. (1985) The turnover of thrombin-thrombomodulin complex in cultured human umbilical vein endothelial cells and A549 lung cancer cells. Endocytosis and degradation of thrombin. *J. Biol. Chem.* **260**: 15432-15438.
- Matsuura, N., Puzon-McLaughlin, W., Irie, A., Morikawa, Y., Kakudo, K. and Takada, Y. (1996) Induction of experimental bone metastasis in mice by transfection of integrin alpha 4 beta 1 into tumor cells. *Am. J. Pathol.* **148**: 55-61.
- Michalovitz, D., Halevy, O. and Oren, M. (1990) Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* **62**: 671-680.
- McNamara, C. A., Sarembock, I. J., Gimple, L. W., Fenton, J. W., Coughlin, S. R. and Owens, G. K. (1993) Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J. Clin. Invest.* **91**: 94-98.
- McNamee, H. P., Ingber, D. E. and Schwartz, M. A. (1993) Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. *J. Cell. Biol.* **121**: 673-678.
- Migeon, J. C. and Nathanson, N. M. (1994) Differential regulation of cAMP-mediated gene transcription by m1 and m4 muscarinic acetylcholine receptors. Preferential coupling of m4 receptors to Gi alpha-2. *J. Biol. Chem.* **269**: 9767-9773.
- Motojima, K., Urano, T., Nagata, Y., Shiku, H., Tsunoda, T. and Kanematsu, T. (1991) Mutations in the Kirsten-ras oncogene are common but lack correlation with prognosis and tumor stage in human pancreatic carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* **86**: 1784-1788.
- Nakajima, M., Hanasaki, K., Ueda, M. and Arita, H. (1992) Effect of pancreatic type phospholipase A2 on isolated porcine cerebral arteries via its specific binding sites. *FEBS lett* **309**: 261-264.
- Nakano, T., Fujita, H., Kikuchi, N., Arita, H. (1994) Plasmin converts pro-form of group I phospholipase A2 into receptor binding, active forms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**: 10-15.

- Nishijima, J., Okamoto, M., Ogawa, M., Kosaki, G. and Yamano, T. (1983) Purification and characterization of human pancreatic phospholipase A₂ and development of a radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* **94**: 137-147.
- Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**: 693-698.
- Oishi, K., Raynor, R.L., Charp, P.A. and Kuo, J. F. (1988) Regulation of protein kinase C by lysophospholipids. *J. Biol. Chem.* **263**, 6865-6871.
- Oishi, K., Zheng, B. and Kuo, J. F. (1990) Inhibition of Na, K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J. Biol. Chem.* **265**: 70-75.
- Okazaki, M., Kishida, S., Murai, H., Hinoi, T. and Kikuchi, A. (1996) Ras-interacting domain of Ral GDP dissociation stimulator like (RGL) reverses v-Ras-induced transformation and Raf-1 activation in NIH3T3 cells. *Cancer Res.* **56**: 2387-92
- Ouwens, D. M., van der Zon, G. C., Pronk, G. J., Bos, J. L., Moller, W., Cheatham, B., Kahn C. R. and Maassen, J. A. (1994) A mutant insulin receptor induces formation of a Shc-growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) complex and p21ras-GTP without detectable interaction of insulin receptor substrate 1 (IRS1) with Grb2. Evidence for IRS1-independent p21ras-GTP formation. *J. Biol. Chem.* **269**: 33116-33122.
- Pang, L., Sawada, T., Decker, S. J. and Saltiel, A. R. (1995) Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **270**: 13585-13588.
- Papp, M., Breuer, J. H., Nemeth, E. P., Fodor, I. and Folly, G. (1973) On the lysolecithin content of the pancreas in experimental acute pancreatitis. *Gastroenterol.* **65**: 778-787.
- Ploug, M., Ronne, E., Behrendt, N., Jensen, A. L., Blasi, F. and Dano, K. (1991) Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* **266**: 1926-1933.
- Portill., D. and Dai, G. (1996) Purification of a novel calcium-independent phospholipase A₂ from rabbit kidney. *J. Biol. Chem.* **271**: 15451-15457.
- Puisieux, A., Lim, S., Groopman, J. and Ozturk, M. (1991) Selective targeting of p53 gene

- mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res.* **51**: 6185-6189.
- Rosselli, F., Ridet, A., Soussi, T., Duchaud, E., Alapetite, C. and Moustacchi, E. (1995) p53-dependent pathway of radio-induced apoptosis is altered in Fanconi anemia. *Oncogene* **10**: 9-17
- Sakai, M., Miyazaki, A., Hakamata, H., Sato, Y., Matsumura, T., Kobori, S., Shichiri, M. and Horiuchi, S. (1996) Lysophosphatidylcholine potentiates the mitogenic activity of modified LDL for human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**: 600-605.
- Sakata, T., Nakamura, E., Tsuruta, Y., Tamaki, M., Teraoka, H., Tojo, H., Ono, T. and Okamoto, M (1989) Presence of pancreatic-type phospholipase A2 mRNA in rat gastric mucosa and lung. *Biochim Biophys Acta* **1007**: 124-126.
- Santavuori, S. A., Kortesoja, P. T., Eskola, J. U. and Nevalainen, T. J. Application of a new monoclonal antibody for time-resolved fluoroimmunoassay of human pancreatic phospholipase A2. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **29**: 819-826.
- Schick, H. D., Berdel, W. E., Fromm, M., Fink, U., Jehn, U., Ulm, K., Reichert, A., Eibl, H., Unger, C. and Rastetter, J. (1987) Cytotoxic effects of ether lipids and derivatives in human nonneoplastic bone marrow cells and leukemic cells in vitro. *Lipids* **22**: 904-910.
- Schröder, T., Kivilaakso, E., Kinnunen, P. K. J. and Lempinen, M. (1980) Serum phospholipase A2 in human acute pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **15**: 633-636.
- Schröder, T., Lempinen, M., Kivilaakso, E. and Nikki, P. (1982) Serum phospholipase A2 and pulmonary changes in acute fulminant pancreatitis. *Resuscitation* **10**: 79-87.
- Seilhamer, J. J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, S., Miller, J. A., Kloss, J. and Johnson, L. K. (1989) Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J. Biol. Chem.* **264**: 5335-5338.
- Shier W. T., Baldwin, J. H., Nilsen-Hamilton, M., Hamilton, R. T. and Thanassi, N. M. (1976) Regulation of guanylate and adenylate cyclase activities by lysolecithin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 1586-1590.
- Smith, J. P., Kramer, S. T. and Solomon, T. E. (1991) CCK stimulates growth of six human

- pancreatic cancer cell lines in serum-free medium. *Regul. Pept.* **32**: 341-349.
- Spangler, E. A., Ryan, T. and Blackburn, E. H. (1988) Developmentally regulated telomere addition in *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic. Acids. Res.* **16**: 5569-5585.
- Streit, M., Schmidt, R., Hilgenfeld, R. U., Thiel, E. and Kreuser, E. D. (1996) Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. *J. Mol. Med.* **74**: 253-268.
- Sugiyama, M., Yuasa, K., Kumagai, T., Kinoshita, E., Matsuo, H., Nishimura, M. and Suzuki, K. (1995) Gene technology to overproduce the enzymes useful as diagnostic reagents. *Jpn. J. Clin. Pathol.* **43**: 765-771.
- Sutherland, E. W. and Rall, T. W. (1958) Fraction and characterization of cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.* **232**, 1077-1091.
- Tahara, E., Semba, S. and Tahara, H. (1996) Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin. Oncol.* **23**: 307-315.
- Tahara, H., Nakanishi, T., Kitamoto, M., Nakashio, R., Shay, J. W., Tahara, E., Kajiyama, G. and Ide, T. (1995) Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* **55**: 2734-2736.
- Takahara, N., Kashiwagi, A., Maegawa, H. and Shigeta, Y. (1996) Lysophosphatidylcholine stimulates the expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells. *Metabolism* **45**: 559-564.
- Tohkin, M., Kishino, J., Ishizaki, J. and Arita, H. (1993) Pancreatic-type phospholipase A₂ stimulates prostaglandin synthesis in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) via a specific binding site. *J. Biol. Chem.* **268**: 2865-2871.
- Tojo, H., Ono, T., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H. and Okamoto, M. (1988) A phospholipase A₂ in the supernatant fraction of rat spleen. *J. Biol. Chem.* **263**: 5724-5731.
- Vaillancourt, R. R., Gardner, A. M. and Johnson, G. L. (1994) B-Raf-dependent regulation of the MEK-1/mitogen-activated protein kinase pathway in PC12 cells and regulation by cyclic AMP. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6522-30
- Verheij, H. M., Slotboom, A. J. and de Haas, G. H. (1981) Structure and function of

- phospholipase A₂. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **91**: 191-203.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., Birrer, M. J., Szabo, E., Zon, L. I., Kyriakis, J. M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. and Kolesnick, R. N. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* **380**: 75-79.
- Villanueva, A., Reyes, G., Cuatrecasas, M., Martinez, A., Erill, N., Lerma, E., Farre, A., Lluís, F. and Capella, G. (1996) Diagnostic utility of K-ras mutations in fine-needle aspirates of pancreatic masses. *Gastroenterol.* **110**: 1587-1594.
- Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I. Coughlin, S. R. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**: 1057-1068.
- Warshaw, A. L. and Fernandez-Del Castillo, C. (1992) Pancreas carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **326**: 455-465.
- Wells, A. D. and Schenk, W. G. (1984) Effectiveness of normal saline solution, Dextran 40 or Dextran 75 and aprotinin (Trasylol) on renal blood flow preservation during acute canine pancreatitis. *Am. J. Surg.* **148**: 624-629.
- Werts, E. D., Burholt, D. R., Paljug, W. R., Polizotto, S. L. and Yann, V. M. (1996) Radiation survival of two human cervical carcinoma cell lines after multifraction irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **35**: 941-950.
- Williams, T. M., Weiner, D. B., Greene, M. I. and Maguire, H. C. Jr. (1991) Expression of c-erbB-2 in human pancreatic adenocarcinomas. *Pathobiol.* **59**: 46-52.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. and Greenberg, M. E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**: 1326-1331.
- Yamada, H., Sakamoto, H., Taira, M., Nishimura, S., Shimosato, Y., Terada, M. and Sugimura, T. (1986) Amplifications of both c-Ki-ras with a point mutation and c-myc in a primary pancreatic cancer and its metastatic tumors in lymph nodes. *Jpn. J. Cancer. Res.* **77**: 370-375.
- Yasumoto, S., Kunimura, C., Kikuchi, K., Tahara, H., Ohji, H., Yamamoto, H., Ide, T. Utakoji, T. (1996) Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* **13**:

433-439.

- Yokote, K., Morisaki, N., Zenibayashi, M., Ueda, S., Kanzaki, T., Saito, Y. and Yoshida, S. (1993) The phospholipase-A₂ reaction leads to increased monocyte adhesion of endothelial cells via the expression of adhesion molecules. *Eur. J. Biochem.* **217**: 723-729.
- Yoshida, J. (1983) Effect of duodenal juice on pathogenesis of gastric ulcer. *Gastroenterol. Jap.* **18**: 21-31.
- Young, H. K., Floyd, R. A., Mardt, M. L. and Dynlacht, J. R. (1996) Evaluation of nitron spin-trapping agents as radioprotectors. *Radiat. Res.* **146**: 227-231.
- Zieve, L. and Vogel, W. C. (1961) Measurement of lecithinase A in serum and other body fluids. *J. Lab. Clin. Med.* **57**: 586-599.

学位論文の基礎となる原著

- 1) Hanada, K., Kinoshita, E., Itoh, M., Hirata, M., Kajiyama, G. and Sugiyama, M.
Human pancreatic phospholipase A2 stimulates the growth of human pancreatic cancer cell line.
(1995) *FEBS Lett.* **373**: 85-87.

- 2) Kinoshita, E., Hanada, K., Itoh, M., Kumagai, T., Kajiyama, G. and Sugiyama, M.
Growth of human pancreatic cancer cells induced by human pancreatic phospholipase A2, is mediated via its specific receptor but not via its catalytic property. (1996)
Int. J. Oncol. **9**: 1219-1225.

- 3) Kinoshita, E., Handa, N., Hanada, K., Kajiyama, G. and Sugiyama, M.
MAP kinase cascade is activated by human pancreatic phospholipase A2 in human pancreatic cancer cell line. *FEBS Lett.* 投稿予定

謝辞

本研究に対し、終始、ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜り、さらに本論文のご校閲を賜りました広島大学医学部総合薬学科 杉山政則教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究を遂行する機会を与えて頂きました広島大学 重中義信名誉教授、ならびに、愛知教育大学 太田忠之教授 に心より感謝申し上げます。

本論文を作成するにあたり、有益なご指導とご助言を賜りました広島大学医学部総合薬学科 高野幹久教授、井出利憲教授、ならびに、藤村欣吾教授に深く感謝致します。

さらに、本研究を遂行するにあたり、終始、暖かいご支援とご協力を頂きました広島大学医学部附属病院第一内科 花田敬士博士、広島大学医学部総合薬学科 熊谷孝則助手、升味紀子教務員、松尾裕彰修士、加藤洋司修士、菊田恵美子学士、伴田典子学士、ならびに、広島大学医学部総合薬学科薬品資源学講座 杉山研究室の皆様 に厚くお礼申し上げます。

最後に、学生生活を精神的、経済的に支えてくれた両親、太田喜久雄氏、ならびに、仲瀬讓二氏に謹んで感謝の意を表します。