

ヒト口腔扁平上皮癌におけるリン酸化型 ERK および MKP-1 の発現について

奈良県立医科大学第1病理学教室

井上 和也, 榎本 泰典, 市島 國雄

鶴見大学歯学部口腔病理学教室

美島 健二

彦根市立病院病理診断科

山田 英二

奈良県立医科大学第2病理学教室

島田 啓司, 小西 登

奈良県立医科大学口腔外科学教室

桐田 忠昭

EXPRESSION OF PHOSPHORYLATED ERK AND MKP-1 IN HUMAN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

KAZUYA INOUE, YASUNORI ENOMOTO and KUNIO ICHIJIMA

First Department of Pathology, Nara Medical University

KENJI MISHIMA

Department of Pathology, Tsurumi University School of Dental Medicine

EIJI YAMADA

Laboratory of Diagnostic Pathology, Hikone Municipal Hospital

KEIJI SHIMADA and NOBORU KONISHI

Second Department of Pathology, Nara Medical University

TADAAKI KIRITA

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nara Medical University

Received December 16, 2002

Abstract : Mitogen-activated protein (MAP) kinase cascades are activated in response to various extracellular stimuli. Extracellular signal-regulated kinase (ERK), a MAPK subfamily, are activated by many oncogenes including ras and raf, which are closely associated with cell growth and differentiation. There is a report that ERK is highly expressed in oral squamous cell carcinoma (OSCC) but it does not include activated forms of ERK (phosphorylated ERK, pERK). Here we examined expression of pERK by immunohistochemical method in 50 OSCC and 7 normal gingival mucosa cases. The positive ratios of immunoreactivity for pERK in nuclei of cells were higher in OSCC than

in normal gingival mucosa. Index of pERK was correlated with Ki-67 index. Interestingly, pERK was also expressed in Ki-67 negative cells in OSCC.

Next, we investigated distribution and expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1), which dephosphorylates and inactivates ERK, by the methods of immunohistochemistry and in situ hybridization (ISH). The distribution of positive signals for protein and mRNA expression of MKP-1 showed almost the same results as demonstrated in pERK. The expression of MKP-1 protein by Western blot analysis was seen in all cases, and the expression in several cases of OSCC was higher than that in normal gingival mucosa.

The results raise a possibility that MKP-1 might be activated in response to ERK activation in cancer cells and suggest that the interaction of two molecules play an important role in proliferation and differentiation of OSCC. Moreover, the assay of MKP-1 expression as well as ERK should provide a good clue to assess the progression or prognosis of OSCC.

Key words: extracellular signal-regulated kinase (ERK), mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1), oral squamous cell carcinoma (OSCC)

緒 言

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) は、真核生物に普遍的に存在し、細胞増殖、細胞分化、ストレス応答および細胞周期制御など多彩な系で、細胞外の刺激を細胞内に伝える細胞内シグナル伝達の中心的な役割を担う¹⁻⁴⁾。extracellular signal-regulated kinase (ERK) は MAPK family のひとつで、epidermal growth factor (EGF), nerve growth factor (NGF), platelet-derived growth factor (PDGF) を始めとする成長因子により、さまざまな癌細胞で速やかにかつ一過性に活性化されることが知られている⁵⁻⁸⁾。ERK は、ras, raf-1, および MAP キナーゼキナーゼ (MEK) によって活性化され、その target 遺伝子は、Elk1, myc, fos, Ets1 および Ets2 などの核内転写因子である⁹⁻¹³⁾。ras の変異がさまざまな癌で見られることはよく知られており、ras の高発現が口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) においても高発現していることが報告されている¹⁴⁻¹⁸⁾。これに関連して Mishima ら¹⁹⁾ はすでに OSCC において ras 下流の ERK が過剰発現していることを報告している。

MAPK phosphatase-1 (MKP-1) は脱リン酸化により ERK の不活性化をきたす酵素であり癌の増殖または進行に深く関与する事が知られ、実験の段階ではあるが培養細胞において癌抑制遺伝子であるという報告もある²⁰⁻²³⁾。しかし、原発癌においては MKP-1 の過剰発現が認められるにも関わらず ERK の脱リン酸化 (不活性化) が

認められないとする報告²⁴⁾ もあり統一した見解が得られていない。このように、MKP-1 の基質自体はまだ明らかになっていない。

ERK および MKP-1 は癌の発癌メカニズムに深く関与していると考えられるが、未だにこれらの2つの分子と発癌との関連、中でも OSCC の発癌および進展に及ぼす影響については分かっておらず、相互関係も十分理解されていない。

そこで今回我々は、OSCC における ERK のリン酸化状態すなわち活性化型 (phosphorylated ERK, pERK) および MKP-1 の発現について詳細な情報を得ることを目的に、pERK および MKP-1 の発現を免疫組織化学、ISH および Western blot 法を用いて詳細に検索した。

材 料 と 方 法

材料

1992年から2001年の間に、奈良県立医科大学口腔外科で生検された50症例のOSCCを用いた。50症例中23例(46%)が高分化型扁平上皮癌、19例(38%)が中分化型扁平上皮癌そして8例(16%)が低分化型扁平上皮癌であった。さらに、OSCC以外の疾病で死亡した剖検症例から正常歯肉粘膜7例を用いた。OSCCの生検標本は歯肉(12例)、舌(24例)、口底(4例)、頬粘膜(4例)、口唇(2例)、口蓋(3例)および上顎洞(1例)であった。OSCC生検標本50症例および正常歯肉粘膜7例の組織は切除後直ちに、10%ホルマリン固定、パラフィン包埋を行った。OSCC

生検標本27症例および正常歯肉粘膜3例の組織は切除後直ちに、4%パラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋を行った。標本はすべて、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

培養細胞

5つのヒトOSCC細胞株(SCCKN, SCCTN, IMC-2, SCC4 および SCC15)を培養した。SCCKN, SCCTN および IMC-2 は RIKEN CELL Bank (Tsukuba, Japan) から購入し50ユニットのペニシリン, 50mg/mlのストレプトマイシンおよび10%胎児牛血清(FBS)を含んだDMEM および RPMI でそれぞれ培養した。

SCC4 および SCC15 は ATCC (VA, USA) から購入し, 10%のFBS, 50ユニットのペニシリン, 50mg/mlのストレプトマイシンおよび400ナノグラム/mlのヒドロコルチゾンを含んだDMEMとF12を1対1で混合し培養した。なお, すべての試薬はシグマ(セントルイス, USA)より購入した。

免疫組織化学

pERK, MKP-1 および Ki-67 について 57 例(OSCC50 例および正常歯肉粘膜7例)で免疫組織化学を行った。4 μ mに薄切しシランコートされたスライドガラスに張り付けキシレンにより脱パラし再水和した。切片は500W電子レンジによって10分間10mMクエン酸塩バッファー(pH 6.0)中で熱し内因性ペルオキシダーゼ活性は10分間3%過酸化水素を含んだメタノール処理によってブロックした。その後, 切片は10分間正常ウサギ血清の中で静置した。各切片は, phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) rabbit polyclonal 抗体(Cell Signaling TECHNOLOGY, MA, USA) (50倍希釈), MKP-1 rabbit polyclonal 抗体(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (500倍希釈)およびKi-67の核抗原であるKi-67 monoclonal 抗体(ZYMED LABORATORIES, CA, USA) (希釈済み)をそれぞれ4℃で一晩反応させた。染色は, diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)で視覚化し, 核はヘマトキシリン染色を行った。抗MKP-1抗体の特異性は, 10倍量の抗原(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)により, 4℃, 24時間放置し証明した。

RNA probe 作製

Total RNA はヒト培養細胞から, acidic guanidinium thiocyanate-phenol chloroform (AGPC)法によって抽出した。さらに, mRNA は OligotexTM-dT30 (Roche, Tokyo, Japan)により分離し, このmRNA から first-

strand cDNA 合成キット (Amersham, International Plc., England)を用いて first strand cDNA を合成した。このcDNAをテンプレートとして, polymerase chain reaction (PCR) 法によってMKP-1 (Hind III-EcoRI 断片, 352bp) cDNA断片を増幅した後, pGem-3Z Vector (Promega Corporation, USA)に挿入した。MKP-1 cDNA断片はMKP-1 cDNAのヌクレオチド761番目から1112番目に相当する。この後, DIG RNA labeling kit (SP6/T7) (Boehringer Mannheim, USA)を用いて, in vitro transcription 法を行い, MKP-1 cDNA断片から mRNA を転写し, 非ラジオアイソトープ標識薬である Digoxigenin で標識した MKP-1 sense RNA probe および antisense RNA probe を作製した。

In Situ Hybridization (ISH)法

57症例中4%パラホルムアルデヒドで固定した30例(OSCC27症例, 正常歯肉粘膜3例)を脱水後パラフィン包埋し, 6 μ mに薄切しスライドガラスに張り付け43℃で一晩乾燥した。切片を脱パラフィン処理後, PBで5分間洗い0.2N HCl中に10分間, 10mg/ml proteinaseK (Sigma, St. Louis, MO, USA), 37℃, 30分間処理の後, 4%パラホルムアルデヒドで10分間, 再固定し, 0.25%の酢酸が入った0.1M triethanolamine (pH8.0)で10分間浸潤した。続いて, プレハイブリダイゼーション液(50% formamide, 1 x Denhardt's, 10mM tris-HCl (pH7.6), 1mM EDTA, 0.25% SDS, 150 μ g/ml salmon testis sperm DNA, 200 μ g/ml tRNA)で, 50℃, 3時間インキュベートした後, digoxigenin でラベルされた250ngのRNA probeを10% Dextran sulfateを加えたプレハイブリダイゼーション液に加え, 50℃, 一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後, 切片を4 x SSCで, 55℃, 5分間, 2 x SSC, 50%ホルムアミドで55℃, 30分間洗い, 0.5M NaCl, 10mM Tris (pH 8.0) 1mM EDTA 37℃で溶解したRNase A (20 μ g/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA)で30分間反応させた。その後, 2 x SCC, 55℃で20分間2回洗い, 切片をTris-buffer (0.1M Tris-HCl, pH7.5, 0.15M NaCl)で浸漬し, アルカリフォスファターゼ標識した抗digoxigenin抗体 (Boehringer Mannheim, USA) (500倍希釈)で, 37℃, 1時間反応させた。0.1M Tris-bufferで洗った後, nitroblue tetrazolium (NBT) および5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (BCIP) (共にBoehringer Mannheim, USA)で発色した。2~4時間の反応後, 1mM EDTAを含む0.01M Tris-HCl (pH8.0)で, 5分間, 浸漬し反応を停止させホルマリンで再固定の後, メチルグリーンで核染し

た。

Western blot 法

細胞は 10cm dish を用いて、20mM pH7.4 の Tris-HCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 1.0% のトリトン X-100, 0.1% の SDS, 25mg/ml の leupeptin と aprotinin, および 1mM PMSF で細胞溶解をおこなった。Total 20 ~ 50µg 蛋白量相当の細胞溶解液を、4-20% の勾配トリスグリシン・ゲルを用いて電気泳動を行った。その後、PVDF メンブレン(Millipore, Bedford, MA)に転写し TBST (100mM pH 7 Tris-HCl, 150mM NaCl および 0.1% Tween20)に 5% スキムミルクおよび 2% 牛血清アルブミンを含んだバッファーで、4°C, overnight ブロッキングを行い、MKP-1 polyclonal 抗体(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (500 倍希釈)で室温、3 時間反応した。メンブレンは、horseradish peroxidase を標識した抗 rabbit IgG 抗体(5000 倍希釈)で反応させた後、化学発光 (Amersham, Arlington Heights)により視覚化した。

統計的分析

組織切片中少なくとも 10 箇所の高発現している部位を任意に選び、1000 細胞をカウントした。癌の分化度と 1000 細胞中 pERK 陽性細胞数 (%) (pERK index とする)との関連は Fisher's exact test によって分析した。pERK index と Ki-67 index との統計学的関連は、Pearson 相関係数を使用して分析した。本研究では免疫組織化学において MKP-1 陽性を示す細胞が 10% 以上の症例を陽性と判断した。また、全 OSCC 症例を pERK index が 25% 以上と未満の 2 つに分け、それぞれのグループの Ki-67 index を比較したところ散布図において 25% を境に 2 峰性分布を示したためこれら 2 群間の比較を行った。

結 果

pERK 蛋白および Ki-67 蛋白の発現

OSCC において pERK 蛋白および Ki-67 蛋白は、正常歯肉粘膜より著しく高発現だったが、OSCC の分化度とに有意な相関は認めなかった (Table 1)。また、pERK 蛋白の陽性細胞率は材料と方法に記した 25% 以上の群および 25% 未満の群の 2 グループ間で Ki-67 蛋白の index と有意な相関がみられた (Table 2)。

正常歯肉粘膜では、pERK 蛋白は基底層と傍基底細胞層の核にみられ、Ki-67 蛋白の分布に類似していた (Fig. 1A, B)。高分化型および中分化型 OSCC 症例では、Ki-67 蛋白は非角化型細胞に有意にみられたが、pERK 蛋白は、Ki-67 蛋白に加えて癌真珠周囲の角化型細胞の核に

もみられた (Fig. 1C, D)。低分化型 OSCC では、pERK 蛋白は癌細胞の核に局限しており、その分布は Ki-67 蛋白とほとんど変わらなかった (Fig. 1E, F)。

MKP-1 蛋白および mRNA の発現

本研究では、MKP-1 蛋白の陽性細胞が全細胞数に対して 10% 以上をもって MKP-1 発現陽性症例とみなした。その結果、正常歯肉粘膜 7 症例中 3 例 (43%) が陽性で、分布は基底層から棘細胞層まで認めたがシグナルは弱く

Table 1. Results of MKP-1 protein staining and indexes of pERK and Ki-67 protein in normal mucosa and OSCC. pERK index, Ki-67 index: medium ratios of positive cells in 1000 counted cells. Two indexes of pERK and Ki-67 protein, and numbers of positive cases of MKP-1 protein are larger in cases of OSCC compared with normal gingival mucosa cases.

Cases	Nos of cases	Nos of MKP-1 positive cases	Index (%)	
			pERK	Ki-67
normal mucosa	7	3	9.9	4.3
well differentiated OSCC	23	23	39.7	29.3
moderately differentiated OSCC	19	17	48.0	38.3
poorly differentiated OSCC	8	6	30.3	33.6

Table 2. Relationship between pERK protein and Ki-67 index in OSCC.

In OSCC, the indexes of pERK protein index and Ki-67 protein index correlate statistically.

Cases	pERK index	Ki-67 index (%)	P value
41	≥25%	35.9	※
9	<25%	21.9	

※ P<0.01

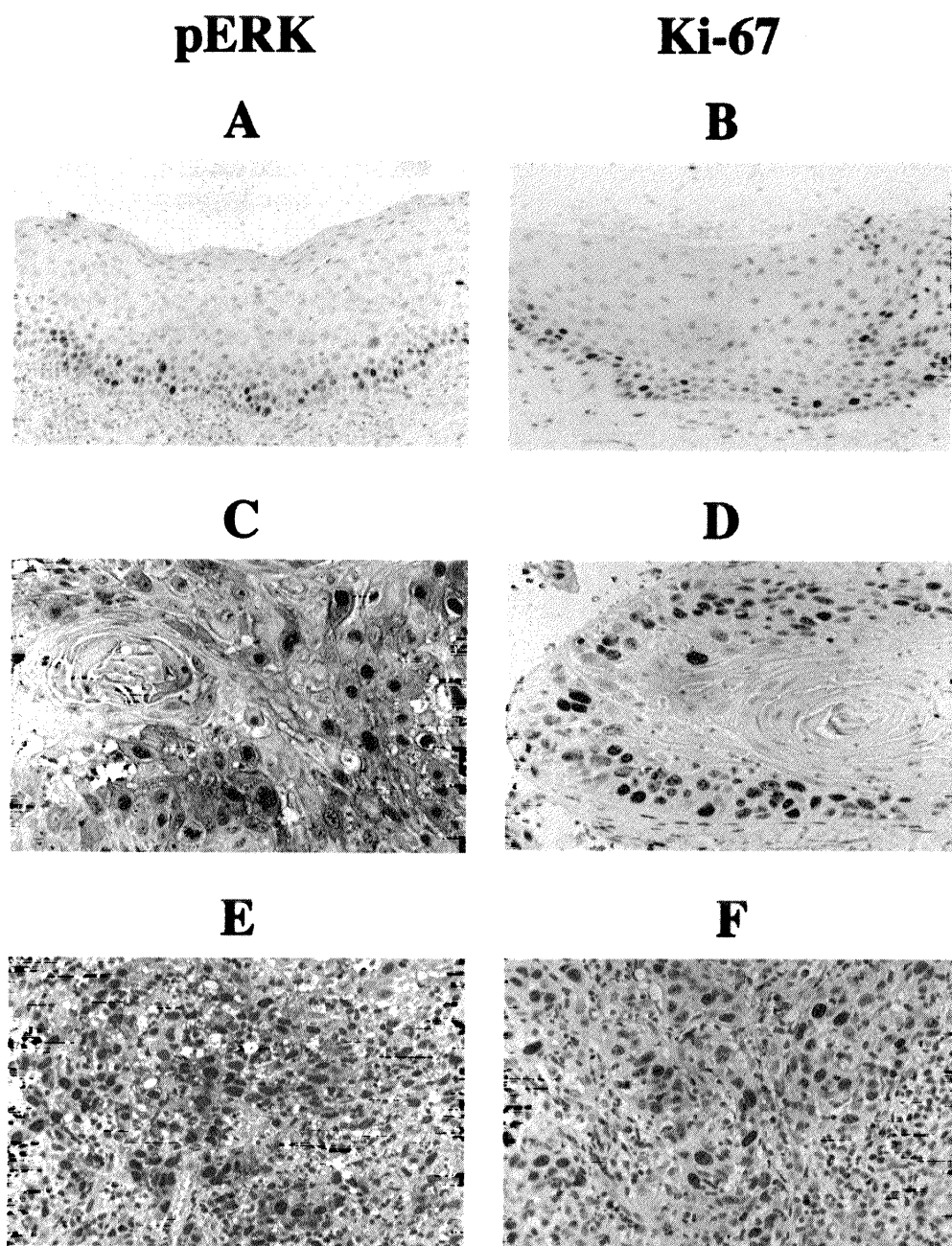


Fig. 1. Immunohistochemical results of pERK protein and Ki-67 protein in normal mucosa and OSCC.

(A), (B): normal gingival mucosa

(C), (D): well differentiated OSCC

(E), (F): poorly differentiated OSCC

In (A), a few positive signals for pERK protein, although very weak, were observed in the basal cell layer.

In (B), positive signals for Ki-67 protein were observed in the basal cell layer. In (C), positive signals for

pERK protein were observed in the nuclei of the outer layer of cancer pearls. In (D), positive signals for

Ki-67 protein were observed in the nuclei of outer cells of cancer nests. In (E), positive signals for pERK

protein were observed in nuclei of almost all cancer cells. In (F), positive signals for Ki-67 protein were ob-

served in almost all cancer cells.

核に限局していた(Fig. 2A). 高分化型 OSCC では 32 症例中 30 例(94%)が陽性で, MKP-1 蛋白は主に癌真珠周辺の角化型細胞に限局していた(Fig. 2B). 低分化型 OSCC では, MKP-1 蛋白は, ほとんど全ての癌細胞にみられた(Fig. 2C). MKP-1 mRNA の分布は, MKP-1

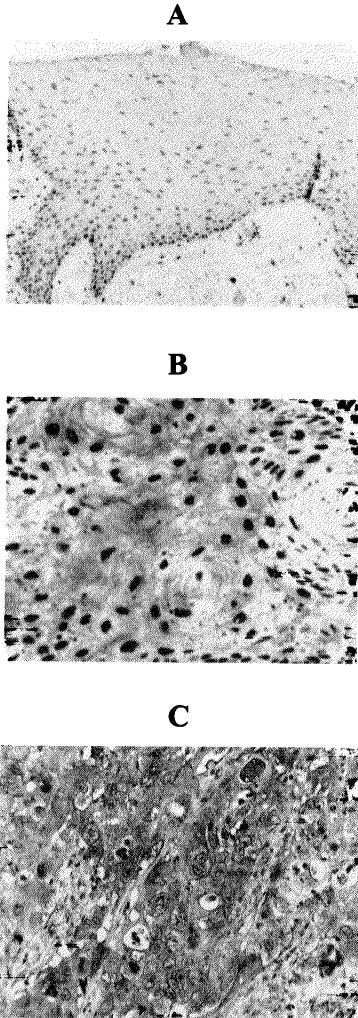


Fig. 2. Immunohistochemical results of MKP-1 protein in normal mucosa and OSCC.

(A): normal gingival mucosa

(B): well differentiated OSCC

(C): poorly differentiated OSCC

In (A), clear positive signals were not observed. In (B), positive signals were observed in the outer layer of cancer nests and in keratotic cells around cancer pearls. In (C), positive signals were observed in almost all cancer cells.

蛋白に類似していた(Fig. 3). 次に Western blot 法により MKP-1 蛋白の発現を検討した所, MKP-1 は OSCC の生検摘出標本 4 例すべてに, 正常歯肉粘膜と同レベル(case2, case3)あるいは明らかに高いレベル(case1, case4)で認められ, 免疫組織化学的検討と一致した(Fig. 4). 確立している OSCC 培養細胞では, 5 種類すべてに明らかな MKP-1 蛋白の発現を確認した(Fig. 5).

考 察

今回の免疫組織化学的検討により, pERK 蛋白は正常歯肉粘膜の基底細胞層の核に弱陽性所見を示す一方 OSCC ではほとんどの癌細胞, 癌巣の外層および癌真珠周囲の角化型細胞の核に陽性所見が認められた. 一般

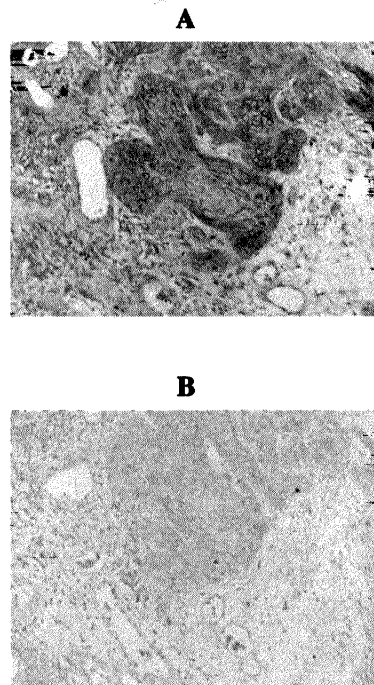


Fig. 3. Results of ISH of MKP-1 mRNA in OSCC.

(A): antisense probe, OSCC

(B): sense probe, OSCC

The localization of MKP-1 mRNA was similar to that of MKP-1 protein. Expression of MKP-1 mRNA was seen at the invasive end in OSCC (A). There was no staining with the sense probe (B). (A) And (B) is the same tissue sections.

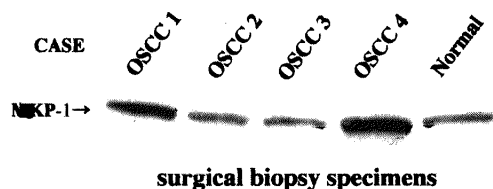


Fig. 4. Western blot analysis for MKP-1 in normal mucosa and OSCC of surgical biopsy specimens. In cases 1 and 4 of OSCC, strong expression of MKP-1 protein was clearly seen when compared with normal gingival mucosa. In cases 2 and 3, the expression of MKP-1 protein was similar to normal gingival mucosa.

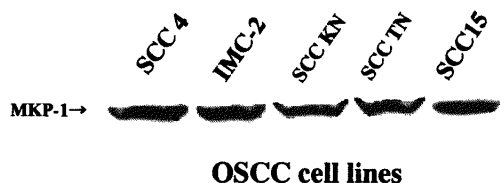


Fig. 5. Western blot analysis for MKP-1 in OSCC cell lines. Expression of MKP-1 protein was confirmed in five OSCC cell lines by Western blot analysis.

的に、ERK 蛋白は平常状態では細胞の胞体に認められるが、活性化するとその発現は核に移行するとされ^{25, 26)}、このことは今回の細胞内分布と一致する。ERK 蛋白の過剰発現および活性化は、OSCC を含めヒト肝細胞癌、腎細胞癌、ヒト胃腺癌、前立腺腫瘍および乳癌のような多くの癌において報告され^{19, 20, 27-29)}、その上流である ras についてもその突然変異が OSCC を含め様々な癌において検出されている^{14-18, 29)}。

正常歯肉粘膜では pERK 蛋白は基底層と傍基底細胞層の核にみられ、Ki-67 蛋白の分布に類似していた。高分化型および中分化型 OSCC 症例では Ki-67 蛋白は非角化型細胞に有意にみられたが、pERK 蛋白は Ki-67 蛋白の陽性シグナルに加えて癌巣の外層および癌真珠周囲の角化型細胞の核にもみられた。低分化型 OSCC 症例ではほとんどの pERK 蛋白の陽性癌細胞は、Ki-67 蛋白陽性を示した。Mishima ら²⁹⁾は、ERK 蛋白およびその mRNA が OSCC において正常歯肉粘膜に比べて癌真珠周囲の角

化型細胞に強く発現することを確認しているが、今回の pERK 蛋白においてもほぼ同様の分布を示した。また、Ki-67 蛋白は増殖細胞を示す指標として病理組織学的解析では頻繁に使用されているが、今回その増殖細胞のマーカーである Ki-67 蛋白と pERK 蛋白の発現については、統計学的に有意な相関がみられた ($p < 0.01$)。これは Albanell ら²⁵⁾の頭頸部扁平上皮癌での Ki-67 蛋白と ERK 蛋白発現における統計報告と一致した所見である。以上の結果は ERK の活性化が OSCC において分化度が低くなるほど、癌細胞の増殖能に深く影響する傾向がみられることを示唆する。ERK が、未分化な培養細胞で EGF および PDGF などの成長因子を介する細胞増殖を促進するという報告があり^{6, 8)}、OSCC においてもこれら増殖因子を介する作用が生じている可能性が考えられる。このことから pERK 蛋白は OSCC において細胞増殖に関与する可能性が示唆される。

一方、MKP-1 蛋白の発現については、ISH 法による MKP-1 mRNA の発現が免疫組織化学による MKP-1 蛋白とはほぼ一致した所見を示し、このことは、MKP-1 蛋白発現の亢進が MKP-1 蛋白の分解が抑制された為でなく MKP-1 の転写活性の促進に基づくものと考えられる。正常歯肉粘膜では基底層から棘細胞層まで認めたが、シグナルは弱く核に限局していた。高分化型および中分化型 OSCC では MKP-1 蛋白はほとんどの症例において癌巣の外層および癌真珠周囲の角化型細胞に陽性所見が認められた。低分化型 OSCC では MKP-1 蛋白陽性細胞はほとんど全ての癌細胞にみられた。Loda ら²⁴⁾は、前立腺癌、大腸癌、膀胱癌および乳癌において MKP-1 mRNA 過剰発現を、Bang ら²⁰⁾は胃腺癌において MKP-1 蛋白の過剰発現がみられることを報告しており、これらのことは、MKP-1 の転写活性が何らかのメカニズムで促進されている為であると考えられる。また興味深い事に pERK 蛋白と異なり正常歯肉粘膜では明らかな陽性を示す細胞は認めなかった。この原因については現時点では不明であるが、OSCC 患者の生検摘出標本と正常歯肉粘膜とを比較すると正常歯肉粘膜の MKP-1 蛋白は OSCC に比較すると減弱していることから MKP-1 は ERK の高発現によりその転写活性が促進され、mRNA および蛋白レベルの発現亢進が生じるのではないかと考え、現在この点は培養細胞を用いてそのメカニズムについて検討中である。この正常歯肉粘膜における MKP-1 蛋白発現が Western blot 法では弱陽性シグナルを示したにも関わらず免疫組織化学ではほとんど陽性シグナルを示さなかった点に関しては、Western blot 法において使用した蛋白量が $50\mu\text{g}$ と比較的多いのと、他の筋肉など

の MKP-1 蛋白が存在しているといわれている組織を含んでいる可能性などが考えられる。また pERK 蛋白高発現状況での MKP-1 蛋白高発現という現象は一見矛盾している所見であるが、Loda ら²⁹⁾は OSCC ではないが MKP-1 蛋白過剰発現での ERK 蛋白の活性化を報告している。これに類似した現象は癌細胞の他の遺伝子においてもみられ、例えば p53 は、p53 を分解する MDM2 の転写活性を促進することが報告されている³⁰⁾。このような類似のことが、OSCC においても ERK と MKP-1 で生じている可能性を考えている。この点については、今後、我々が MKP-1 発現を確認した 5 種類の OSCC 培養細胞を用いてより分子生物学的に検討していかなければならない。

今回の我々の研究で、統計的に有意な相関は認めなかったが ERK のリン酸化すなわち ERK の活性化は、OSCC において分化度が細胞増殖に重要な影響を与えている可能性があると考えられた。Schmidt ら³¹⁾によると、角化型細胞の Ca 依存性の分化の際に ERK の活性化が認められると報告しており OSCC においても推測ではあるが pERK が細胞増殖だけでなく細胞分化にも深く影響を与えている可能性が示唆される。このことについては今後検討していく必要があると考えている。

また、その脱リン酸化因子である MKP-1 mRNA および蛋白については OSCC において正常歯肉粘膜に比較してより強い発現が認められ、確立された 5 種全ての細胞株でも同様に発現が認められたことから、我々は MKP-1 も ERK に関連して癌の進展や予後に深く関与するのではないかと考えている。これまで数多くの研究者が ERK の細胞増殖に及ぼす影響について指摘している^{6, 8, 19, 20, 27, 28)}が、MKP-1 と癌に関する報告は非常に稀であり、また OSCC において分化度に大きく依存している点や MKP-1 との相関性については本研究で初めて明らかにされたことであり、今回の研究が臨床病理学分野や口腔外科領域に貢献することが期待される。

結 論

1. ヒト口腔扁平上皮癌において、活性化型 ERK 蛋白、MKP-1 mRNA および蛋白の発現が正常歯肉粘膜に比較して顕著に増加していた。
2. ヒト口腔扁平上皮癌においては細胞増殖能と活性化型 ERK 蛋白に有意な相関がみられた。
3. ヒト口腔扁平上皮癌においては活性化型 ERK 蛋白が細胞増殖の他、分化についても重要な役割を担う可能

性が示唆された。

4. MKP-1 mRNA および蛋白がヒト口腔扁平上皮癌において正常歯肉粘膜に比較してより強く発現しており ERK に関連してその癌化のメカニズムに関与している可能性が考えられる。

文 献

- 1) Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A. and Pouyssegur, J. : Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **122** : 1079-1088, 1993.
- 2) Nishida, E. and Gotoh, Y. : The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* **18** : 128-131, 1993.
- 3) 榊井勝也・山田英二・下川原立雄・榎本泰典・市島國雄 : 迷走、舌下神経核における JNK isoform の発現の差異. *奈医誌.* **52** : 213-218, 2001.
- 4) 下川原立雄・山田英二・榊井勝也・榎本泰典・井上和也・市島國雄 : 軸索切断後の迷走神経核および舌下神経核の神経細胞とグリア細胞における p38MAP kinase の発現. *奈医誌.* **53** : 37-45, 2002.
- 5) Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L. and Ulevitch R.J. : A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265** : 808-811, 1994.
- 6) Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewski, 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.
- 7) Landreth, G.E., Smith, D.S., McCabe, C. and Gittinger, C. : Characterization of a nerve growth factor-stimulated protein kinase in PC12 cells which phosphorylates microtubule-associated protein 2 and pp250. *J. Neurochem.* **55** : 514-523, 1990
- 8) Gomez, N. and Cohen, P. : Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* **353** : 170-

- 173, 1991.
- 9) Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb MH. and Shaw, PE. : ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* 14 : 951-962, 1995.
 - 10) Schmitz-Drager, BJ., Schulz, WA., Jurgens, B., Gerharz, CD., van Roeyen, CR., Bultel, H., Ebert, T. and Ackermann, R. : **C-myc in bladder cancer** : clinical findings and analysis of mechanism. *Urol. Res.* 25(Suppl) : S45-S49, 1997.
 - 11) Rochlitz, CF., Herrmann, R. and de Kant E. : Overexpression and amplification of c-myc during progression of human colorectal cancer. *Oncology* 53 : 448-454, 1996.
 - 12) Jones, GJ., Heiss, NS., Veale, RB. and Thornley AL. : Amplification and expression of the TGF- α , EGF receptor, and c-myc genes in four human oesophageal squamous cell carcinoma lines. *Biosci. Rep.* 13 : 303-312, 1993.
 - 13) Jung, M., Notario, V. and Dritschilo, A. : Mutations in the p53 gene in radiation-sensitive and -resistant human squamous carcinoma. *Cancer Res.* 52 : 6390-6393, 1992.
 - 14) Baba, M., Yamamoto, R., Iishi, H. and Tatsuta, M. : Ha-ras mutations in N-nitrosomoupholine-induced lesions and inhibition of hepatocarcinogenesis by antisense sequences in rat liver. *Int. J. Cancer* 72 : 815-820, 1997.
 - 15) Satoh, M., Hatakeyama, S., Sashima, M. and Suzuki, A. : Immunohistochemical detection of ras 21 in oral squamous cell carcinomas. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 74 : 469-472, 1992.
 - 16) Holst, VA., Finkelstein, S., Colby, TV., Myers, JL. and Yousem, SA. : p53 and K-ras mutational genotyping in pulmonary carcinosarcoma, spindle cell carcinoma, and pulmonary blastoma : implications for histogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* 21 : 801-811, 1997.
 - 17) Kuo, MY., Chang, MH., Hahn, LJ., Wang, JT. and Chiang CP. : Elevated ras p21 expression in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma in Taiwan. *J. Oral pathol. Med.* : 255-260, 1995.
 - 18) Sakata, K. : Alterations of tumor suppressor genes and the H-ras oncogene in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral pathol. Med.* 25 : 302-307, 1996.
 - 19) Mishima, K., Yamada, E., Masui, K., Shimokawara, T., Takayama, K., Sugimura, M. and Ichijima, K. : Overexpression of the ERK/MAP Kinases in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mod. Pathol.* 11 : 886-891, 1998.
 - 20) Bang, YJ., Kwon, JH., Kang, SH., Kim, JW. and Yang YC. : Increased MAPK Activity and MKP-1 Overexpression in Human Gastric Adenocarcinoma. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 250 : 43-47, 1998.
 - 21) Sun, H., Charles, CH., Lau, LF. and Tonks, NK. : MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75 : 487-493, 1993.
 - 22) Sun, H., Tonks, NK. and Bar-Sagi, D. : Inhibition of Ras-induced DNA synthesis by expression of the phosphatase MKP-1. *Science* 266 : 285-288, 1994.
 - 23) Keyse, SM. and Emslie, EA. : Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* 359 : 644-647, 1992.
 - 24) Loda, M., Capodiceci, P., Mishra, R., Yao, H., Corless, C., Grigioni, W., Wang, Y., Magi-Galluzzi, C. and Stork, PJS. : Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 149 : 1553-1564, 1996.
 - 25) Albanell, J., Codony-Servat, J., Rojo, F., Del Campo, JM., Sauleda, S., Anido, J., Raspall, G., Giral, J., Rosello, J., Nicholson, RI, Mendelsohn, J. and Baselga, J. : Activated Extracellular Signal-regulated Kinases : Association with Epidermal Growth Factor Receptor/Transforming Growth Factor α Expression in Head and Neck Squamous Carcinoma and Inhibition by Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Treatments. *Cancer Res.* 61 : 6500-6510, 2001.
 - 26) Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G.,

- L'Allemain, G., Brunet, A. and Pouyssegur, J. : Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **122** : 1079-1088, 1993.
- 27) Schmidt, CM., Mckillop, IH., Cahill, PA. and Sitzmann JV. : Increased MAPK Expression and Activity in Primary Human Hepatocellular Carcinoma. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **236** : 54-58, 1997.
- 28) Cristina, MG., Rodolfo, MM., Giulia, C., Kenneth, W. and Massimo, L. : Mitogen-activated protein kinases and apoptosis in PIN. *Virchows Arch.* **432** : 407-413, 1998.
- 29) Mishima, K., Inoue, K. and Hyashi, Y. : Overexpression of extracellular-signal regulated kinases on oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **38** : 468-474, 2002.
- 30) Mayo, LD. and Donner DB. : The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem. Sci.* **27** : 462-467, 2002.
- 31) Schmidt, M., Goebeler, M., Posern, G., Feller, SM., Seitz, CS., Brocker, EB., Rapp, UR. and Ludwig, S. : Ras-independent Activation of the Raf/MEK/ERK Pathway upon Calcium-induced Differentiation of Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **275** : 41011-41017, 2000.