

## 論文の内容の要旨

論文題目 肝細胞増殖調節機構における p53 の意義

指導教官：小俣 政男 教授

東京大学医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 井上 有希子

### 要約

肝再生は肝障害、肝部分切除後の回復課程における必須の事象である。今日まで、肝再生調節機構を解明するため多くの研究がなされてきた。近年、培養肝細胞を用いた検討から、多くの増殖促進因子が報告されている。これらの中で、transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) およびhepatocyte growth factor (HGF) は、*in vitro* だけでなく *in vivo* においても肝細胞の増殖を促進する。また複数のラット肝再生モデルにおいて、HGF に引き続き TGF- $\alpha$  の肝における発現が亢進し肝細胞増殖が認められることから、両因子が協調して肝再生調節機構に関与している可能性が推定されている。我々は、動物実験、培養肝細胞を用いた検討から、HGF が肝細胞の TGF- $\alpha$  産生を促進すること、たとえば HGF 存在下であっても肝細胞増殖にはこの TGF- $\alpha$  が必要である事を報告した。しかし、肝細胞増殖における TGF- $\alpha$  の HGF による誘導の機序は不明である。

p53 は一般に癌抑制遺伝子として知られているが、その本質は

transcription factor であり、様々な effector gene を活性化することによって多彩な機能を発現する。悪性細胞および障害細胞においては p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 等を介しての細胞周期の停止、PIG3 等を介してのアポトーシスの誘導等細胞増殖に抑制的な働きが知られている。Effector gene の発現はそのプロモーター領域への sequence-specific な p53 の結合による転写活性化で調節され、DNA 損傷の性質、広がり、部位に応じて p53 を介した転写調節および機能発現が選択される。一方、非腫瘍性細胞においても p53 は様々な調節に関与していると推定されるが、その意義は充分には解明されていない。近年培養細胞株において、p53 により TGF- $\alpha$  のプロモーターが活性化されるとの報告がなされた。相前後して、p53 が増殖促進因子およびその受容体等関連物質の発現制御により細胞増殖促進的に働きうることを示唆する報告が相次ぎ、この観点からの p53 の意義が注目されている。肝再生においては、部分肝切除後のラット再生肝において従来、細胞周期の G1 期の中期から後期にかけて p53 mRNA が増加することが知られていた。p53 が増殖抑制的に働いているとするとこの発現増加は説明が困難であり、この場合、p53 が増殖促進的に働いている可能性がある。

以上の知見をふまえて、我々は肝細胞増殖における p53 の意義を解析するため、肝細胞増殖時の HGF と TGF- $\alpha$  の連繋における p53 の役割に焦点をしばって検討を行った。まず最初にラット部分切除肝において p53 蛋白量を経時的に定量し、HGF、TGF- $\alpha$  および肝細胞増殖の動態と対比し検討した。更に、ラット初代培養肝細胞を用いて p53 産生の抑制実験を行い、HGF 存在下での TGF- $\alpha$  および DNA 合成への影響を検討した。

#### 動物実験：

5~6 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットに 2/3 部分肝切除術および対照として開腹術のみを施行し、肝の p53 蛋白量の経時的变化を検討した。p53 蛋白量は術前値に比し術後 8 時間目には明らかに増加し、12~16 時間目に術

前値の 8~10 倍となり、以降は徐々に低下し 96 時間目にはほぼ前値に復した。開腹術のみ施行したラット肝では軽度の増加がみられたのみであった。従来、p53 mRNA はラット部分肝切除後 8~16 時間目に肝で約 5 倍に増加すると報告されている。今回の p53 蛋白の増加はほぼ同時期に認められ、その程度は p53 mRNA の増加に比し高度であった。これは p53 の発現は転写後にも調節を受けると報告されているのと合致する結果と推定される。そこで以降の検討における p53 の発現は p53 蛋白を同様に直接定量することとした。また以前我々は、肝部分切除ラットにおける HGF は部分肝切除施行 6 時間後より肝にて上昇を開始し、12~18 時間後にピークを迎え、これに遅れて TGF- $\alpha$  は 12 時間後から上昇し、24 時間後にピークとなる事、肝細胞の Mitotic Index はこの TGF- $\alpha$  の動きに更に遅れて上昇する事を報告している。部分切除ラット肝における p53 の上昇はこの HGF の上昇にほぼ一致し、また、TGF- $\alpha$  および肝細胞増殖の上昇に先行していると考えられた。

培養肝細胞を用いた検討：

1)  $2.5 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup> で培養したラット初代培養肝細胞を用いて、HGF の肝細胞における p53 量および DNA 合成に対する影響を検討した。0~20 ng/ml の濃度の HGF を培地に添加、18 時間培養し細胞中 p53 蛋白量を測定した。p53 量は濃度依存的に増加し 10 ng/ml で最大となった。5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) の取り込みにより測定した DNA 合成も同様な HGF 添加に対する濃度依存的な増加がみられた。

2) HGF 存在下の肝細胞における p53 蛋白量および DNA 合成の経時的変化を検討した。10ng/ml の濃度の HGF 添加により肝細胞中 p53 量は培養開始 6 時間目から増加し、18 時間後にピークとなり以後徐々に低下した。この増加は HGF 非添加群に比し有意に高度であった。DNA 合成は、HGF 添加 24 時間目から有意に上昇し、30 時間目にピークとなった。肝細胞において p53 は HGF により誘導され、その増加は DNA 合成の上昇より先行していると推定

された。また、p53 量の増加は肝細胞数の増加によりもたらされたものとは考えられず、個々の細胞において増加していると考えられた。

3) HGF 存在下の肝細胞において p53 アンチセンス添加の p53 蛋白量に対する影響を検討した。HGF および p53 アンチセンス オリゴヌクレオチドまたは対照として同量の A、T、G、C を含み random に並べたナンセンス オリゴヌクレオチドを培地に加え 24 時間培養後、肝細胞中 p53 量を測定した。アンチセンス添加により肝細胞中 p53 蛋白量は濃度依存的に抑制されたのに対してナンセンス添加群では有意な変化は見られなかった。またアンチセンス添加群では肝細胞の総蛋白量は変化せず、肝細胞の viability は影響を受けていないと考えられた。

4) p53 アンチセンス添加による HGF 存在下の肝細胞における TGF- $\alpha$ 量および DNA 合成に対する影響を検討した。肝細胞中 TGF- $\alpha$ 量は p53 アンチセンスの濃度依存的に低下し、対照のナンセンス添加群に比し有意であった。同様に DNA 合成も、HGF 存在下であるにもかかわらず p53 アンチセンスの添加によりナンセンス添加群に比し著明に抑制された。我々は HGF は培養肝細胞の TGF- $\alpha$ 量を濃度依存的に増加させる事、この TGF- $\alpha$ の作用を抑制すると DNA 合成も抑制される事を報告している。p53 アンチセンスによって p53 産生を抑制すると、HGF 存在下であっても肝細胞中 TGF- $\alpha$ 量が減少し DNA 合成も抑制されたことから、p53 産生抑制による DNA 合成の抑制は、肝細胞の TGF- $\alpha$ 産生抑制を介したものである可能性があると思われた。

結論：p53 は肝細胞増殖における HGF と TGF- $\alpha$ の連繫に関与することにより肝細胞増殖促進的に働いている可能性が推定された。