

審査の結果の要旨

氏名 井上 有希子

本研究ではその本質は transcription factor である p53 の肝再生における意義を解析するため、肝細胞増殖時の重要な増殖因子である HGF と TGF- α の連繋における p53 の役割に焦点をしばって検討を行い、下記の結果を得ている。

1. 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 蛋白量の経時的変化を検討した。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。この p53 の経時的変化を以前我々が報告した増殖因子および肝細胞増殖の動態と対比すると、p53 の上昇は HGF の上昇にほぼ一致し、また、TGF- α および肝細胞増殖の上昇に先行していると考えられた。
2. 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。
3. 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。10 ng/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。

4. HGF 存在下の肝細胞において p53 アンチセンス オリゴヌクレオチドを用いた p53 産生の抑制実験を行った。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用いた。まず p53 アンチセンス添加肝細胞中の p53 量を測定し p53 アンチセンスの実際の効果を確認したところ、p53 アンチセンス添加群の肝細胞中 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 p53 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。
5. 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- α 量および DNA 合成に対する影響を検討した。肝細胞中 TGF- α 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。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- α 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- α 産生抑制を介したものである可能性があると想われた。

以上、本論文は肝細胞増殖時には HGF により産生が促進された p53 は、TGF- α 産生を刺激し、肝細胞増殖に促進的に働き得るという知見をもたらした。本研究はそれまで明らかではなかった、p53 の肝細胞増殖調節機構における意義の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。