

肝細胞および肝癌細胞の増殖状態における プロテインホスファターゼ PP1 の動態とその意義

学位論文内容の要旨

本研究では、肝細胞の増殖調節におけるセリン／スレオニン残基特異的 I 型プロテインホスファターゼ PP1 の役割を明らかにする目的で以下の実験を行なった。

第 1 章：当研究室においてこれまでに、各種移植性腹水肝癌細胞の PP1 の動態を調べたところ、移植性腹水肝癌細胞において mRNA、核画分における PP1 活性、酵素タンパク量のすべてが上昇していることを見出した。その詳細を明らかにする為に、従来用いた腹水肝癌細胞の 1 つである AH13 細胞に加えて、由来の異なる肝癌細胞であるヒト HepG2 細胞を用いて、さらに検討を加えた。① PP1 活性は細胞粗抽出液では正常肝細胞と肝癌細胞に差が見られないのに対し、核画分においては肝癌細胞で上昇を示した。②細胞粗抽出液では肝癌細胞で PP1 α および PP1 γ 1 タンパク量が上昇していた。③核画分においては肝癌細胞で PP1 α および PP1 δ タンパク量が上昇していた。HepG2 細胞と AH13 細胞において以上 3 つの特徴があった。これらの PP1 の変異は肝癌細胞の特徴であると考えられた。

第 2 章：当研究室においてこれまでに、ラット肝再生過程および EGF で刺激した初代培養肝細胞において、G₁ / S 期で核内 PP1 活性が一過性に上昇したことを認めた。そこで、G₁ / S 期における核内 PP1 活性の一過性の上昇が正常肝細胞に特異的な現象であるか否かを検討するため、同調可能な肝癌細胞である HepG2 細胞を同調し、核内 PP1 活性、酵素タンパク量の動態を調べた。また、肝細胞の生理的増殖因子である HGF で初代培養肝細胞を刺激し、生理的にも G₁ / S 期で活性上昇がおこるか否かについて確認した。HepG2 細胞の同調方法には 2 種類すなわち血清飢餓同調と薬剤同調を用いて行なったが、いずれの場合も、正常肝細胞と同様に G₁ / S 期において核内 PP1 活性の一過性の上昇が見られた。また、HGF で刺激した初代培養肝細胞においても G₁ / S 期において核内 PP1 活性の一過性の上昇が認められた。しかしながら、正常肝細胞と肝癌細胞

胞を比較すると、肝癌細胞の核内 PP1 活性の basal レベルが高く、逆に活性の上昇は正常肝細胞の方が高いという差異があった。肝細胞の細胞周期において G₁/S 期を通過するのに、細胞の悪性度に拘わらずある一定以上の PP1 活性が必要であるように思われる。

第 3 章: 正常肝細胞の増殖促進因子である HGF は肝癌細胞に対しては増殖抑制的に働くことが知られている。そこで、増殖抑制状態における PP1 の関与を探る目的で、まず非同調 HepG2 細胞を HGF で刺激し、DNA 合成への影響を確認し、同条件下で PP1 の動態を解析した。HGF により DNA 合成が抑えられた HepG2 細胞において、PP1 活性、酵素タンパク量は核画分および非核画分ともに HGF 刺激の有無による変化は見られなかった。従って、HGF による癌特異的な増殖抑制効果については、PP1 は関与していないことが示唆された。

第 4 章: 3 章では HGF 刺激の有無により HepG2 細胞の PP1 の動態に変化は見られなかったが、核画分において PP1 活性はプレーティング後 6 時間において、一過性の減少を認めた。この減少のメカニズムを解明する目的で、HepG2 細胞を様々な細胞密度でプレーティングを行ない、培養初期における核内 PP1 活性および酵素タンパク量の経時的変化を測定した。核内 PP1 活性の一過性減少は細胞密度が粗である時は見られたが、密である時は見られなかった。したがって、この一過性の減少が細胞密度に依存していることがわかった。しかしながら、この時の酵素タンパク量は一定であり、PP1 が何らかの post-translational な修飾を受け、活性変化をおこしていることが示唆された。

第 5 章: EGF で刺激した初代培養肝細胞は通常、5~7 日しか生育できずに死滅するが、ニコチンアミドを加えて培養すると、増殖はしないが 30 日以上生きのびるという報告がある。そこで、増殖はしないが 30 日以上生きのびるという条件下における PP1 の動態を調べる目的で、PP1 の酵素活性、mRNA および酵素タンパク量等の経時的変化を調べた。EGF のみで刺激した肝細胞の PP1 活性は 9 日目まで急激に上昇を示したが、ニコチンアミドを加えた肝細胞の PP1 活性は緩やかに 9 日目まで上昇を示し、その活性は EGF のみで刺激したものと比べて低い値を示し、その後ほぼ一定となった。この活性上昇は PP1 α 、PP1 γ 1 の mRNA 量および PP1 α の酵素タンパク量に反映していた。EGF のみで刺激した肝細胞は PP1 の活性上昇異常により、生体内のリン酸化-脱リン酸化のバランスを崩し、死を招くが、ニコチンアミドにより PP1 の転写や活性が抑制されることにより細胞死を免れるのかも知れない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菊 池 九二三

副 査 教 授 東 市 郎

副 査 教 授 矢 澤 道 生

学 位 論 文 題 名

肝細胞および肝癌細胞の増殖状態における プロテインホスファターゼ PP1 の動態とその意義

細胞増殖の調節は、標的タンパクの可逆的リン酸化により調節されている。本研究は、肝細胞の増殖調節におけるセリン／スレオニン残基特異的 1 型プロテインホスファターゼ PP1 の役割を明らかにする目的で種々の肝細胞増殖条件において、PP1 の動態を解析したもので、本論文の要点は以下の 4 点にまとめられる。

1. ラット腹水肝癌細胞の 1 つである AH13 細胞に加えて、ヒト肝癌細胞である HepG2 細胞を用いて、mRNA、核画分における PP1 活性、酵素タンパク量を検討して次の結果を得た。① PP1 活性は細胞粗抽出液では正常肝細胞と肝癌細胞に差が見られないのに対し、核画分においては肝癌細胞で上昇を示した。②細胞粗抽出液では肝癌細胞で PP1 α および PP1 γ 1 タンパク量が上昇していた。③核画分においては肝癌細胞で PP1 α および PP1 δ タンパク量が上昇していた。以上の差異は、HepG2 細胞と AH13 細胞において共通していた。よって PP1 の変異は肝癌細胞の特徴であると考えられた。

2. EGF で刺激した初代培養肝細胞において、G₁ / S 期に核内 PP1 活性の一過性の上昇を認めたが、これが正常肝細胞に特異的な現象であるか否かを検討するため、同調可能な肝癌細胞である HepG2 細胞を同調し、核内 PP1 活性、酵素タンパク量の動態を調べた。また、肝細胞の生理的増殖因子である HGF で初代培養肝細胞を刺激し、生理的にも G₁ / S 期で活性上昇がおこるか否かについて検討した。HepG2 細胞の同調方法には 2 種類すなわち血清飢餓同調と薬剤同調を用いて行なったが、いずれの場合も、正常肝細胞と同様に G₁ / S 期において核内 PP1 活性の一過性の上昇が見られた。また、HGF で刺激した初代培養肝細胞においても G₁ / S 期において核内 PP1 活性の一過性の上昇が認められた。しかしながら、正常肝細胞と肝癌細胞を比較すると、肝癌細胞の核内 PP1 活性の basal レベルが高く、逆に活性の上昇は正常肝細胞の方が大きかった。肝細胞の細胞周期において G₁ / S 期を通過するのに、細胞の悪性度に拘わらずある一定以上

の PP1 活性が必要であるように思われる。

3. 正常肝細胞の増殖促進因子である HGF は肝癌細胞に対しては増殖抑制的に働くことが知られている。そこで、増殖抑制状態における PP1 の関与を探る目的で、まず非同調 HepG2 細胞を HGF で刺激し、DNA 合成への影響を確認し、同条件下で PP1 の動態を解析した。HGF により DNA 合成が抑えられた HepG2 細胞において、PP1 活性、酵素タンパク量は核画分および非核画分ともに HGF 刺激の有無による変化は見られなかった。従って、HGF による癌特異的な増殖抑制効果については、PP1 は関与していないことが示唆された。

4. HepG2 細胞のプレーティング後 6 時間において、核局在性 PP1 活性の一過性の減少を認めた。この減少のメカニズムを解明する目的で、HepG2 細胞を様々な細胞密度でプレーティングを行ない、培養初期における核内 PP1 活性および酵素タンパク量の経時的変化を測定した。核内 PP1 活性の一過性減少は細胞密度が粗である時は見られたが、密である時は見られず、この一過性の減少が細胞密度に依存していることがわかった。この時の酵素タンパク量は一定であり、PP1 が何らかの post-translational な修飾を受け、活性変化をおこしていることが示唆された。

5. EGF で刺激した初代培養肝細胞は通常、5~7 日しか生育できずに死滅するが、ニコチンアミドを加えて培養すると、増殖はしないが 30 日以上生きのびる。そこで、増殖はしないが 30 日以上は生きのびるこの条件下に、PP1 の酵素活性、mRNA および酵素タンパク量等の経時的変化を調べた。EGF のみで刺激した肝細胞の PP1 活性は 9 日目まで急激に上昇を示したが、ニコチンアミドを加えた肝細胞の PP1 活性は緩やかに 9 日目まで上昇を示し、その活性は EGF のみで刺激したものに比べて低い値を示し、その後ほぼ一定となった。この活性上昇は PP1 α 、PP1 γ 1 の mRNA 量および PP1 α の酵素タンパク量に反映していた。EGF のみで刺激した肝細胞は PP1 の活性上昇異常により、生体内のリン酸化一脱リン酸化のバランスを崩し、細胞死を招くが、ニコチンアミドにより PP1 の転写や活性が抑制されることにより、これを免れる可能性が示唆された。

これを要するに、著者はセリン/スレオニンプロテインホスファターゼ PP1 について肝細胞の増殖状態と細胞周期での役割について新知見を得たもので、プロテインホスファターゼの機能面において貢献するところ大なるものがある。よって、著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。