

## 肝癌におけるプロテインチロシンホスファターゼ

### PTP $\delta$ の癌性変異とその意義

#### 学位論文内容の要旨

タンパク質のチロシンリン酸化レベルは、リン酸化を担うプロテインチロシンキナーゼ (PTK) と、脱リン酸化を触媒するプロテインチロシンホスファターゼ (PTP) によって動的な平衡が保たれ、分化・増殖・癌化等、細胞機能の制御に重要な役割を果たしている。これまで発見された癌遺伝子の多くは PTK 活性を有しており、この PTK 活性に拮抗する PTP については早くから癌抑制遺伝子である可能性が示唆されてきたが、癌性変異について明らかな知見は得られていなかった。

一方、肝臓は様々な機能を有する高度に分化した臓器であるが、肝細胞の再生能は保たれている。ラット肝臓を 70 % 切除すると、残余肝細胞は増殖を開始し、約 10 日後には切除前の肝容積にまで回復し、増殖停止、肝特異的な機能の再発現がおこる。この過程において *c-fos*, *c-myc*, *c-Ki-ras* 等の細胞癌遺伝子 (*c-onc*) mRNA の量的上昇がみられ、細胞周期の進行に何らかの役割を果たしていると考えられている。他方、どのような機構が働いて肝再生を終結させるのかについては不明な点が多い。当研究室では肝再生過程における PTP の関与を明らかにすることを目的とし、10 種の PTP mRNA 発現量の動態を検討した。その結果、3 種のレセプター型 PTP、すなわち PTP $\delta$ , PTP $\gamma$  並びに LAR の mRNA 発現量が、肝再生が終了する部分肝切除後 7 ~ 10 日において特異的に増加することを見いだした。このことから、これらのレセプター型 PTP が i) 肝細胞の増殖に抑制的に働いている、ii) 肝特異機能発現に関与している、の二つの可能性が考えられた。また、以上の PTP は遺伝子マッピング等から癌抑制遺伝子である可能性も考えられてきている。

本論文では PTP と肝癌細胞の増殖・肝臓分化との関連を知ることを目的とし、各種へパトーマでの癌性変異、ならびにノックアウトマウスでの肝特異的な機能発現への関与について検討した。要点を次の 3 点にまとめた。

1. ヘパトーマにおける上記レセプター型 PTP の mRNA 発現量を Northern Blotting にて定量した。原発肝癌組織は、代表的な癌原性アゾ色素の一つである 3'-メチル-4-ジメチルアゾベンゼン投与にてラットに肝癌を誘発させた肝癌組織 (DAB 肝癌), Solt-Farber モデルにて誘発した肝癌組織 (S / F 肝癌) の 2 種を用いた。肝癌培養細胞としては高分化型ヘパトーマである HepG2, 低分化型の移植性腹水肝癌細胞 (AH 細胞) とを用いた。その結果, いずれの原発肝癌組織においても PTP $\delta$  mRNA 発現量のみが正常肝でのそれに比べ著しく減少していた。HepG2 細胞, AH 細胞では, PTP $\delta$  mRNA はほとんど検出感度以下のレベルまで減少していた。PTP $\gamma$ , LAR では, その mRNA 発現量について一定した傾向は見られなかった。以上のことから PTP $\delta$  が肝癌細胞の増殖に関与している可能性が考えられた。

2. PTP $\delta$  mRNA 遺伝子の HepG2 細胞へのトランスフェクションを試みた。PTP $\delta$  分子の一過性発現は確認されたが, 安定発現しているクローンが得られなかった。このことから, PTP $\delta$  を発現しているクローンの増殖が抑制され, クローニングの過程において死滅した可能性が考えられた。これは上述の, ヘパトーマにおいて PTP $\delta$  mRNA 発現量が正常組織のそれに比べて著しく低下しているという結果を支持するものと考えられた。

3. PTP $\delta$  の肝分化機能発現への関与を見当するために, PTP $\delta$  ノックアウトマウスにて, 発生に伴う肝の分化が正常マウスのそれと等しく行われるか否かを糖代謝系酵素を指標として解析した。グルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase), ホスホリラーゼ, ヘキソキナーゼの 3 種の酵素を対照とした。G6Pase は胎児期での発現はみられず, 出生前後に活性が上昇する。ホスホリラーゼには胎児型, 筋型, 肝型の 3 種のアイソザイムが存在し, 肝では発生に従い, 胎児型から分化型の肝型に入れ換わる。ヘキソキナーゼにはタイプ I から IV まで 4 種のアイソザイムが存在し, 成体肝における分化型アイソザイムはタイプ IV である。また, タイプ IV ヘキソキナーゼはグルコキナーゼと別称される。生後 day 18, day 19 そして day 38 のマウスを用いた。G6Pase 活性はノックアウトマウス肝では正常マウス肝に比して同程度か若干高い活性がみられた。イムノブロッティングの結果, ノックアウトマウス肝では抗肝型ホスホリラーゼ抗体と反応するバンドが得られ, 一方, 抗胎児型抗体と反応するバンドは検出されなかった。グルコキナーゼは活性は day 19 ノックアウトマウスでは活性がみられなかったが, day 38 ノックアウトマウスでは, 正常マウスと, ほぼ同程度の活性が得られた。よって, ノックアウトマウス肝においても糖代謝系酵素の分化・発現が正常肝と同様に営まれていると考えられた。

以上の結果から、PTP $\delta$ は肝特異的分化機能の発現ではなく、肝（癌）細胞の増殖抑制に関与していることが強く示唆された。

# 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

## 肝臓におけるプロテインチロシンホスファターゼ

### PTP $\delta$ の癌性変異とその意義

タンパク質のチロシンリン酸化レベルは、リン酸化を担うプロテインチロシンキナーゼ (PTK) と、脱リン酸化を触媒するプロテインチロシンホスファターゼ (PTP) によって動的な平衡が保たれ、分化・増殖・癌化等、細胞機能の制御に重要な役割を果たしている。これまで発見された癌遺伝子の多くが PTK 活性を有しており、この PTK 活性に拮抗する PTP については早くから癌抑制遺伝子である可能性が示唆されてきたが、癌性変異について明らかな知見は得られていない。

また、肝臓は高度に分化した臓器であるが、肝細胞の再生能は保たれている。ラット肝臓を 70 % 切除すると残余肝細胞は増殖を開始し、約 10 日後には切除前の肝容積にまで回復し、増殖停止・肝特異的な機能の再発現がおこる。この過程において *c-fos*, *c-myc*, *c-Ki-ras* 等の細胞癌遺伝子 mRNA の量的上昇がみられ、細胞周期の進行に何らかの関与をしていると考えられている。他方、肝再生終結の機構については不明な点が多い。われわれは 3 種のレセプター型 PTP, PTP $\delta$ , PTP $\gamma$  並びに LAR の mRNA 発現量が、肝再生の終了する部分肝切除後 7 ~ 10 日において増加することを見いだした。このことからこれらのレセプター型 PTP が i) 肝細胞の増殖に抑制的に働いている, ii) 肝特異機能発現に関与している, の二つの可能性が考えられた。

本論文では PTP と肝癌細胞の増殖・肝臓分化との関連を知ることを目的とし、各種ヘパトーマでの癌性変異, ならびに出生に伴う肝特異的な機能発現への関与について検討した。要点は次の 3 点にまとめられる。

1. ヘパトーマにおける上記レセプター型 PTP の mRNA 発現量を ノーザン

プロットニングにて定量した。原発肝癌組織は 3'-メチル-4-ジメチルアゾベンゼン投与にてラットに肝癌を誘発させた肝癌組織，Solt-Farber モデルにて誘発した肝癌組織の 2 種を用いた。肝癌培養細胞としては高分化型ヘパトーマ HepG2，低分化型の移植性腹水肝癌細胞（AH 細胞）を用いた。その結果，いずれの原発肝癌組織においても PTP $\delta$  mRNA 発現量のみが正常肝でのそれに比べ著しく減少していた。HepG2 細胞，AH 細胞では PTP $\delta$  mRNA は検出感度以下のレベルまで減少していた。PTP $\gamma$ ，LAR の mRNA 発現量については一定した傾向は見られなかった。以上のことから PTP $\delta$  が肝癌細胞の増殖抑制に関与している可能性が考えられた。

2. PTP $\delta$  mRNA 遺伝子の HepG2 細胞へのトランスフェクションを試みた。PTP $\delta$  分子の一過性発現は確認されたが，安定発現しているクローンは得られず，PTP $\delta$  を発現しているクローンの増殖が抑制され，クローニングの過程において死滅した可能性が考えられた。これは，上述のヘパトーマにおいて PTP $\delta$  mRNA 発現量が正常組織のそれに比べて著しく低下しているという結果を支持するものと考えられた。

3. PTP $\delta$  の肝特異的機能発現への関与を検討するために，PTP $\delta$  ノックアウトマウスにて発生に伴う肝分化が正常マウスのそれと等しく行われるか否かを糖代謝系酵素を指標として解析した。グルコース-6-ホスファターゼ（G6Pase），ホスホリラーゼ，ヘキソキナーゼの 3 種の酵素を対象とした。G6Pase は胎児期での発現はみられず，出生前後に活性が上昇する。ホスホリラーゼには胎児型，筋型，肝型の 3 種のアイソザイムが存在し，肝では出生に従い胎児型から分化型の肝型に入れ換わる。ヘキソキナーゼにはタイプ I から IV まで 4 種のアイソザイムが存在し，成体肝での分化型アイソザイムはタイプ IV（グルコキナーゼ）である。生後 18 日，19 日，そして 38 日のマウスを用いた。G6Pase 活性はノックアウトマウス肝では正常マウス肝に比して同程度か若干高い活性がみられた。イムノプロットニングの結果，ノックアウトマウス肝のホスホリラーゼアイソザイムは分化型の肝型であった。グルコキナーゼ活性は生後 19 日ノックアウトマウスでは活性が認められなかったが，生後 38 日ノックアウトマウスでは正常マウスとほぼ同程度の活性が得られた。よって，ノックアウトマウス肝においても糖代謝系酵素の分化・発現が正常肝と同様に営まれていると考えられた。

これを要するに，著者はチロシンホスファターゼ PTP $\delta$  が肝特異的分化機能の発現ではなく，肝（癌）細胞の増殖抑制に関与していることを示唆し，肝癌における PTP $\delta$  の機能面につ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。