

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	IFN- γ による肝細胞障害機構の解明
Title(English)	
著者(和文)	狩野有宏
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第3489号, 授与年月日:1997年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第3489号, Conferred date:1997/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

IFN- γ による肝細胞障害機構の解明

バイオテクノロジー専攻

狩野有宏

目次

ページ

1	第一章 序論
2	1-1 肝臓について
2	1-1-1 肝臓とその構造、機能
2	1-1-2 肝臓の構成細胞
5	1-2 肝炎について
5	1-2-1 ヒトの肝炎
6	1-2-2 サイトカイン
7	1-2-3 Interferon (IFN) について
8	1-2-4 IFN の抗ウイルス作用
9	1-2-5 IFN- γ の細胞増殖阻害活性と細胞死誘導活性 について
10	1-2-6 IFN- γ の細胞内シグナル伝達
11	1-3 細胞増殖（細胞周期）と細胞死（アポトーシス）
13	1-4 IFN- γ と肝実質細胞における細胞生物学的研究の意義
14	図表
22	第二章 初代培養肝細胞の増殖活性、及びIFN- γ によるその DNA合成の阻害と細胞障害性の解析
23	2-1 緒言
24	2-2 試薬と実験方法
24	2-2-1 試薬
24	2-2-2 肝細胞の単離と培養
25	2-2-3 肝細胞 DNA 合成活性の測定
26	2-2-4 肝細胞の Lactose Dehydrogenase 放出量の測定
26	2-2-5 肝細胞の DNA fragmentation の観察
26	2-2-6 単離肝細胞核のフローサイトメトリーによる細胞周 期

の測定と核の断片化の同定

27	2-3 結果
27	2-3-1 初代培養肝細胞の DNA 合成活性
27	2-3-2 IFN- γ による肝細胞の DNA 合成阻害と障害性の検討
28	2-3-3 フローサイトメトリーによる単離肝細胞核の DNA 含量の解析とIFN- γ の影響の検討
30	2-3-4 IFN- γ による肝細胞の DNA 合成阻害の kinetic analysis
30	2-3-5 IFN- γ によって誘導される肝細胞死の評価
31	2-3-6 タンパク合成の特異的阻害剤のIFN- γ によって誘導される肝細胞死への影響
31	2-3-7 IFN- γ によって誘導される肝細胞死への各種特異的阻害剤の影響
32	2-3-8 IFN- γ によって誘導される肝細胞死に対するプロテアーゼ阻害剤の影響
33	2-3-9 CPP32 の特異的阻害剤 Ac-DEVD-cho のIFN- γ によって誘導される肝細胞死にともなう形態変化、及び染色体 DNA の断片化に対する影響
34	2-3-10 マウス肝癌細胞 Hepa 1-6 に対するIFN- γ の影響
35	2-4 考察
39	図表

54 第三章 IFN- γ による肝細胞障害における癌抑制因子 p53 の解析

55	3-1 緒言
57	3-2 試薬と実験方法
57	3-2-1 試薬
57	3-2-2 初代培養肝細胞の単離と培養
57	3-2-3 核タンパク抽出液の調製

57	3-2-4	免疫沈降とウエスタンブロッティング
58	3-2-5	RNA の抽出とノザンブロッティング
59	3-2-6	プローブの作成
60	3-3	結果
60	3-3-1	IFN- γ で刺激した初代培養肝細胞におけるp53タンパク質発現の検討
61	3-3-2	IFN- γ で刺激した初代培養肝細胞における p53 mRNA の検討
61	3-3-3	IFN- γ で刺激した初代培養肝細胞における Cdk inhibitor p21 ^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNAの検討
62	3-4	考察
65		図表
72	第四章 IFN- γ の p53 欠損肝細胞に対する影響	
73	4-1	緒言
75	4-2	試薬と実験方法
75	4-2-1	試薬
75	4-2-2	肝細胞の単離
75	4-2-3	アンチセンス oligo nucleotide の設計
75	4-2-4	p53 欠損マウス
75	4-2-5	p53 プライマーの作成
76	4-2-6	RNA の抽出とノザンブロッティング
76	4-2-7	プローブの作成
77	4-3	結果
77	4-3-1	IFN- γ による肝細胞の DNA 合成阻害に及ぼす anti-sense p53 oligo nucleotide の影響
77	4-3-2	p53 欠損マウスから単離した肝細胞の p53 targeting の確認
78	4-3-3	p53 欠損肝細胞の DNA 合成とIFN- γ の影響
78	4-3-4	p53 欠損肝細胞におけるIFN- γ の細胞死誘導活性
79	4-3-5	IFN- γ による p53 欠損肝細胞の細胞死誘導におけ

	る形態変化の観察	
79	4- 3- 6	IFN- γ による p53 欠損肝細胞の細胞死誘導におけるタンパク合成阻害剤の影響
79	4- 3- 7	IFN- γ で刺激した p53 欠損肝細胞における Cdk inhibitor p21 ^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の検討
81	4- 4	考察
84		図表
92	第五章	結論
93	5- 1	結論
95	5- 2	今後の課題
97		図表
98	参考文献	
105	業績リスト	
106	謝辞	

第一章

序論

1-1 肝臓について

1-1-1 肝臓とその構造、機能

発生学的には、肝臓は、胎生期に胎児肝として造血機能を有し、免疫担当細胞を産生するが、やがて新生期に造血機能は骨髓に移行する。そして正常な肝臓は体内の中心に位置する最大の臓器となり、成人体重の2-5 %を占める。肝臓はいくつもの葉に分かれており、肝門部で一つとなる。肝臓を構成するのは大部分肝実質細胞（肝細胞）であり、肝細胞は肝細胞索、あるいは肝細胞板を形成し、中心静脈の回りに放射状に配列し、ほぼ六角形の肝小葉をつくっている⁽¹⁾（Figure 1-1, 1-2）。

肝臓の主な機能としては

- a) 栄養に関係の深い中間代謝
 - b) 胆汁の生産
 - c) 解毒と異物除去
 - d) 発熱、その他血液の貯蔵により循環量の調整
- などがある。

1-1-2 肝臓の構成細胞⁽²⁾

正常肝臓は全体の7割を占める肝実質細胞とそれ以外の非実質細胞から構成される。以下に肝臓を構成する主な細胞について記す。

- a) 肝実質細胞

肝臓の約 7 割を占め、肝細胞といえばふつう肝実質細胞を指す。丸みを帯びた多角形で、6 あるいはそれ以上の面を持ち、約径18-26 μm の大きさである。面には3種類あり、類洞周囲隙に向く面（40-50 %）、細胞同士の接合面（30-40 %）、毛細胆管を囲む面（10 %）である。核は大型で球形、表面はすべらかで多くは単核であるが、老化すると多核も増える。60 %以上が4倍体である。肝臓の主な機能はこの肝実質細胞が担う。

b) 類洞内皮細胞

肝類洞内壁に存在する血管内皮細胞の一種であり、一般的な血管内皮細胞と類似点が多い。

c) クッパー細胞

肝臓内の常在性マクロファージ。星状の形を取り類洞壁に接着することが観察され、移動の際には管腔にそうと考えられている。その機能は、老廃物や不溶物、外来異物の排除である。クッパー細胞は実質細胞や非実質細胞に作用するサイトカインやエンドトキシンなどを取り込むと活性化し、プロテアーゼやサイトカインを分泌する。マクロファージ系の細胞が持つ抗原提示などの免疫化学的な機能をクッパー細胞が持つのかについては明らかとなっていない。

d) 星細胞（イトウ細胞、Fat-storing cell、Perisinusoidal cell）

星細胞は類洞周辺部に位置し、類洞内皮の回りに囲まれ細胞質部分が進展する。星細胞の Ca^{2+} 依存的な収縮によって類洞の血流が調節されている。星細胞はビタミンAを細胞内に貯蔵しているが、その意義は不明である。いろいろな刺激によってmyofibroblast 様の細胞に転移し、desminや α -smooth muscle actinを細胞内に発現するようになる。これらは星細胞活性化マーカーとして広く用いられてい

る。

e) Pit 細胞

Pit 細胞は類洞内壁部分に存在し、NK 細胞のような大型顆粒リンパ球に相当する。菌体やウイルスの感染、また腫瘍の転移に対して防御的な役割を持つと考えられている。

肝臓はその大部分を肝実質細胞が占め、そして肝機能の大部分を肝実質細胞が担っているが、ここに示したような多くの細胞が相互に、そして密接に関係しあいながらその恒常性を維持している。従って、ウイルスや細菌の感染、薬物やマイトジェンなどの刺激による肝臓の異常（肝炎）は肝実質細胞の障害によるものではあるが、これらのバランスが崩れたことによるものであると考えられる。

1-2 肝炎について

1-2-1 ヒトの肝炎

肝炎はその原因あるいはその進行状況によって分類される⁽²⁾。原因はウイルス性や自己免疫性、薬物、アルコールなどがある。肝炎ウイルスにはA型からF型まで存在し、その中で感染者が多く良く研究されているのはA、B、C型である。これらの肝炎ウイルスは主に肝細胞に感染するが、感染細胞に対して障害性を持たない。つまり、ウイルスの感染細胞の破壊は、宿主の免疫機能が関わることが示唆されている⁽³⁾。しかしそれにはどのような細胞障害反応が関わるか不明である。アルコール性や薬物性肝炎は自己免疫性肝炎の一種であると考えられ、これらの患者の血清中には肝細胞の膜タンパク質（アシアログリコプロテインなど）に対する抗体の産生が見られる。しかし、何故このような抗体が産生されるようになるのか、あるいは何故外来の薬物などが免疫系を惹起させるのかは不明である。

原因が何であれ、肝炎の特徴として主に肝細胞が障害を受けることや、肝細胞からと思われる酵素 aspartate aminotransferase (AST) あるいは alanine aminotransferase (ALT) の放出が起こること、慢性化した場合肝硬変に陥ることなどがあげられる。肝細胞が広範に破壊されると、肝臓が機能しない肝不全に陥り、脳障害が誘発され、意識を失い死に至る。肝不全の直接的な原因は肝細胞の破壊であるが、何によって肝細胞が破壊されるのか不明である。広範な肝細胞の破壊にともなって好中球やNK細胞、T細胞などの免疫細胞の浸潤が観察されることから、免疫細胞による肝細胞の破壊が考えられる⁽⁴⁻⁸⁾ (Figure 1-3, 1-4)。

肝炎や肝硬変の原因に免疫機能が関与する事が一般概念として定着し、その障害

の実体は肝臓の大部分を占める肝実質細胞の障害であることが明らかにされている。従ってIFN- γ が直接肝細胞を障害することが示されたことは肝炎研究の上でも重要であるとともに、細胞生物学においても細胞の増殖、分化、死という本質的生命活動を理解する上で極めて重要な知見であると考えられる。

1-2-2 サイトカイン^(9, 10)

サイトカインとは分子量2万から5万程度で糖鎖修飾を受けたポリペプチドで、主として免疫系に作用するホルモン様分子である。元来サイトカインとは、遅延型アレルギーなどの細胞性免疫や炎症性化学メディエーターとしての活性定義として使われ、単球系細胞などから放出されるものをモノカイン、リンパ球から産生されるものをリンフォカインと称していた。しかしながら現在ではその他種々の細胞が多少なりとも産生するのでサイトカインと呼ばれるようになった。さらに広い意味ではその活性の広さや重複性のため血小板増殖因子（PDGF）や上皮増殖因子（EGF）などの従来増殖因子として研究されていた因子もサイトカインと考えられるようになっている。

一方で炎症部位で発現がみられたり、炎症反応と深く関わるサイトカインを炎症性サイトカインと呼び、Interleukin-1、-6、-8、(IL-1、-6、-8)、やTumor Necrosis Factor (TNF)、Interferon- γ (IFN- γ)、マクロファージ走化性因子（MCF）などが含まれる。

サイトカインにより制御される細胞応答は複製の誘導あるいは阻害、分化の誘導、細胞の生存維持あるいは細胞死の誘導、細胞の化学遊走、成熟と機能発現など極めて多彩である。当初はサイトカインは抗体やT細胞レセプターと異なり、特異

的な抗原認識能は持たないが、細胞系列特異的に作用することが予想されたため、T細胞増殖因子、B細胞増殖因子、肥満細胞増殖因子など標的細胞に基づき名称が付けられ、それぞれ異なる因子であると考えられていた。しかしながら多くのサイトカインが多機能性であること、細胞系列ごとに独立して直線的に作用するよりも、相互に関連したネットワークとして作用することが次第に明らかとなった。肝臓では肝臓を構成するすべての細胞がサイトカインを産生し、そして様々な種類のサイトカインが産生されている (Table 1-1)。また脾臓には多くのマクロファージやリンパ球が存在し、脾臓からくる血液はすべてまず肝臓に入ることから、脾臓からくるサイトカインも重要な意味を持っていると考えられる。さらに全身を循環する免疫担当細胞の産生するサイトカインの作用とともに複雑なサイトカインネットワークを形成し、肝臓全体の調和を保っている。

1-2-3 Interferon (IFN) について ^(9, 11)

IFN はウイルスなどの刺激を受けた動物細胞がつくり出し、細胞外に分泌する抗ウイルス物質として 1950 年代に発見された ⁽¹²⁾。その後の研究の進展により、抗腫瘍作用や免疫系の活性化などいくつかの生体防御システムの活性化に関連する多面的作用を持つことが知られるようになった。哺乳動物では大別して α 、 β 、 γ 型の 3 種の IFN がある。 α 、 β 型は化学構造的に相同性があり、総称して I 型 IFN とも呼ばれる。I 型 IFN とは化学構造的に全く異なる γ 型は 1965 年に、ヒトリンパ球をマイトジェン処理することにより産生される抗ウイルス活性のある IFN 様物質として発見され ⁽¹³⁾ II 型 IFN とも呼ばれる。IFN- γ は抗ウイルス効果をはじめ、細胞増殖抑制効果、抗腫瘍効果、マクロファージ活性化、ナチュラルキラー細胞の活

性増強、免疫応答調節作用、分化誘導の調節作用など多くの点でⅠ型 IFNと共通の生物活性を示す多機能因子である⁽¹⁴⁾。IFN- γ もウイルス感染その他に対する生体防御機構、特に免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられている。IFNの様々な活性を Figure 1-5. にまとめた。

1-2-4 IFN の抗ウイルス作用⁽¹¹⁾

IFN は構造的に大きく異なるⅠ型とⅡ型が存在するが、IFNレセプターもそれに対応して、Ⅰ型 IFN に特異的なⅠ型レセプターとIFN- γ に特異的なⅡ型レセプターの2種類がある。IFN の作用効果は、原則的に産生細胞と同種動物の細胞にのみ及ぶという動物種特異性があるが、それは IFN とレセプターとの親和性によるものである。また、IFN レセプターは生物個体の大部分の細胞で発現していると考えられている。

IFN の抗ウイルス活性を担う中間分子の主なものとして、二本鎖 RNA 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKR : protein kinase dsRNA-dependent)、二本鎖 RNA 依存性2', 5'オリゴアデニル酸合成酵素 (2-5A synthetase) などがある。PKRは二本鎖 RNA 存在下で ATP によりタンパク合成伸張開始因子 eIF-2 α をリン酸化して不活性にし、リボソームと mRNA の複合体 (ポリソーム) の形成を阻害する。2-5Aseは二本鎖 RNA 存在下で ATP から2', 5'オリゴアデニル酸 (2-5An)を合成し、その結合によってRNase Lが活性化され、mRNAを加水分解する。2', 5'ホスホジエステラーゼで 2-5An が加水分解を受けると RNase L は不活化する。これらの酵素群は連携し合ってウイルスタンパク質の合成を阻害し、ウイルス増殖の阻害をもたらすと考えられる。

実際の抗ウイルス効果に対するこれらの寄与の程度はウイルスの種類に依存し、未知の機構の関与もあり得る。

1-2-5 IFN- γ の細胞増殖阻害活性と細胞死誘導活性について

IFN- γ のレセプターは個体のほとんどの細胞に存在すると考えられるため共通の活性を示すと考えたくなるが、実際には細胞によってその活性は大きく異なる。その理由の一つがレセプターの数の違いであることが示されている^(15, 16)。すなわち、レセプターが少ないものは増殖へと向かい、レセプターが多いものは細胞死へと向かうというものである。IFN- γ によって細胞増殖が阻害されたり、細胞死を誘導される細胞の報告は決して多くはなく、初代培養系では内皮細胞で報告されている程度である⁽¹⁶⁾。また株化細胞についても系統だった報告はない。最近上皮様細胞株 Hela 細胞を使って、IFN- γ の細胞増殖阻害活性や、細胞死誘導活性を解析し、さらに、anti-sense library からスクリーニングすることによってIFN- γ によって誘導される細胞死に関わる gene を次々とクローニングした報告があった⁽¹⁷⁻²¹⁾。ただしこの場合のIFN- γ によって誘導される細胞死の検定には一週間程度の培養が必要であり、このことはIFN- γ の活性の多様性や、上記したレセプター数の違いによる活性の違いといったことから暗示されることであると思われる。つまり、IFN- γ の刺激が増殖抑制や、細胞死誘導といった活性にいたるまでには、多くのステップを経なければならないのではないかと、あるいは少なくともある種のIFN- γ 誘導性細胞死では、増殖抑制（細胞周期停止）の作業が細胞死誘導に必須であるかもしれない。実際先の Hela 細胞では増殖の停止が、細胞死の前に必要であると報告

されている。また初代培養肝細胞では当研究室による各種炎症性サイトカインの検討によりIFN- γ の障害活性が示された⁽²²⁾。

1-2-6 IFN- γ の細胞内シグナル伝達

IFNの細胞内シグナル伝達は近年精力的に研究され、JAK-STAT系として明らかとなった。IFNレセプターとサイトカインレセプタースーパーファミリーと呼ばれるレセプターファミリー (Table 1-2) は、PDGFレセプターやEGFレセプターとは異なりそのレセプター分子自体はチロシンキナーゼ活性を持たない。ところが例えばIL-3やGM-CSFなどにおいてリガンドの刺激により細胞内タンパク質のチロシンリン酸化が促進されることが観察されていた。このギャップを埋めるものとしてJAK-STAT系は登場してきた。

JAKチロシンキナーゼは、チロシンキナーゼに保存されたドメインをもとに作成された重複プローブを用いたRT-PCR法などによってクローニングされ、Just Another Kinaseの頭文字より名前が付けられた^(23 - 26)。そしてのちに厳密な細胞遺伝学的手法によりIFN- α のシグナル伝達に必須の遺伝子として、報告された^(27 - 30)。またSTATは当初IFN- α , β 誘導性転写に必須の転写因子ISGF 3のコンポーネントとして見いだされ、後にやはり細胞遺伝学的手法によりシグナル伝達を担い、またチロシンリン酸化を受けた後核に移行し、転写因子として働くことが分かり、STAT (signal transducers and activators of transcription) と命名されることが提唱された⁽³¹⁾。IFN- γ のシグナル伝達では、IFN- γ 刺激によって

JAK 1、JAK 2 が活性化し、それらによって STAT 1 がリン酸化を受けてホモダイマーとなり、核に移行してIFN- γ 誘導性転写を行うことが明らかとなっている⁽³²⁻

35)。

1-3 細胞増殖（細胞周期）と細胞死（アポトーシス）

細胞増殖（細胞周期）は、単細胞生物から多細胞生物まで細胞で構成されている生物の根幹を担う基本的現象である。動物細胞の細胞周期についてはサイクリンやサイクリン依存性キナーゼの発見により近年急激に進展した^(36 - 49)。細胞周期は大きく分けて、間期（interphase）と分裂期（M）に分けることが出来る。分裂期には細胞分裂という劇的な変化が観察されるが、間期では大きな変化は観察できない。この間期の真ん中に染色体複製を行うS期が存在し、その前後にそれぞれG1期（gap1）とG2期（gap2）が存在する。G1期ではDNA合成の準備が行われ、S期でDNA合成が行われる。そしてG2期では細胞分裂の準備が行われ、M期で細胞分裂が行われ再びG1期に戻る。細胞が増殖する際にこの一連の過程を繰り返し経過することから細胞周期と呼ばれる。Rbタンパク質は網膜芽細胞腫の原因遺伝子として初めてクローニングされた癌抑制遺伝子であるが、このRbタンパク質がサイクリン依存性キナーゼによって細胞周期特異的リン酸化を受けて増殖能を失うことが示され、癌研究と細胞周期研究が初めて結びついた^(50 - 53)。そしてさらにSV40 large T抗原と結合するタンパク質の一つとして発見されていた癌抑制遺伝子p53が、サイクリン依存性キナーゼと結合してその活性を阻害するタンパク質p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}を転写レベルで発現誘導することが明らかにされた^(54, 55)。p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}はサイクリン依存性キナーゼインヒビター（Cdk inhibitor）としてクローニングされたほかに、細胞老化に関与する遺伝子（Senescent cell-derived inhibitors : Sdi）としても同時にクローニングされている⁽⁵⁶⁾。このように細胞周期の研究は癌研究の見地からもその重要性が認識されることとなった（Figure 1-6）。

一方、アポトーシスと呼ばれる細胞死はその形態的特徴からでてきた概念であり、細胞容積の縮小、核の網羅構造の消失と凝縮、細胞膜表面の微絨毛の消失及び水泡の形成、それに続くアポトーシス小体（細胞の断片化）の形成を特徴としている。programmed cell death (PCD) と考えられる細胞死（アポトーシス）は、個体の秩序だった正常な発生に必要であり、また成長後も不必要になった細胞の除去などによる個体の恒常性の維持に重要な役割を担っていると考えられている。癌抑制遺伝子 p53はアポトーシスの誘導にも関与していることが数多く報告されている⁽⁵⁷⁻⁶¹⁾。そしてDNAの損傷によってp53 タンパク質の発現が増加することから、遺伝情報の損傷を見張る番人として機能すると考えられている。

このように細胞増殖（細胞周期）と細胞死（アポトーシス）は、個体の発生と恒常性の維持という生命現象の基本をなす細胞現象であると考えられ、細胞生物学及び医学的見地からもますます重要な研究テーマとなっている。

1-4 IFN- γ と肝実質細胞における細胞生物学的研究の意義

本テーマは当初肝炎や肝硬変での肝細胞障害に対する炎症性サイトカインの関与を細胞生物学的に明らかにすることを目的に始まった。そしてその結果、IFN- γ が肝細胞に直接障害性を有することが明らかとなった。このことは、肝炎や肝硬変が免疫系の異常であるといわれ、そして免疫担当細胞が産生する炎症性サイトカインの重要性が指摘されながらもその実体が明らかにならなかった現状において、極めて重要な知見であると考えられる。したがって、つぎはIFN- γ が肝細胞に対しどのようなようにして障害性を持ち、そしてそのことはどのような意味を持っているかを明らかにすることが必要である。また、近年の細胞生物学の分野において細胞増殖（細胞周期）と細胞死（アポトーシス）の研究は、癌研究や血管新生、あるいは多くの疾患や細胞の基本的生理活動の理解のためにますますその重要性を増している。そのような状況の中で、IFN- γ が肝細胞の増殖活性を強力に抑制し、また細胞死を誘導するという現象は非常に興味深く、格好の実験材料であることは間違いない。

近年の細胞増殖（細胞周期）と細胞死（アポトーシス）の研究の進展ぶりはすさまじいものがある。しかしながら、その研究のほとんどは株化した細胞でなされ、巧みな遺伝学的手法を用いている。それに対し本研究は初代培養肝細胞で主になされた。これまでに初代培養細胞に対するIFN- γ の作用を分子レベルで検討した研究はなく、特に肝細胞に関しては、その細胞障害性の報告も当研究室で初めて成された。本研究では、IFN- γ による肝細胞障害機構の解明を目的とした。

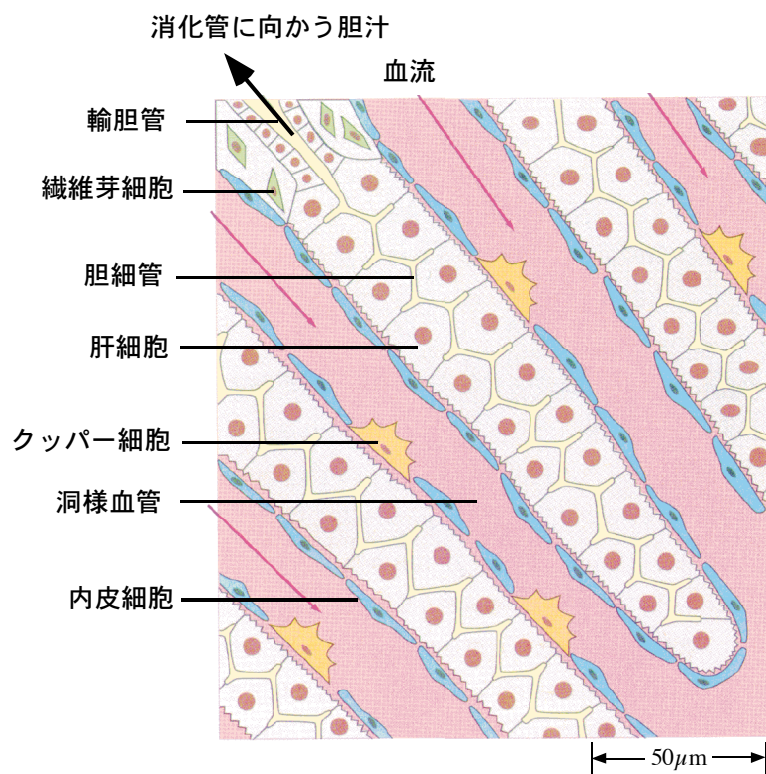


Figure 1-1 肝臓の微細構造

(参考文献、細胞の分子生物学 第3版、教育社)

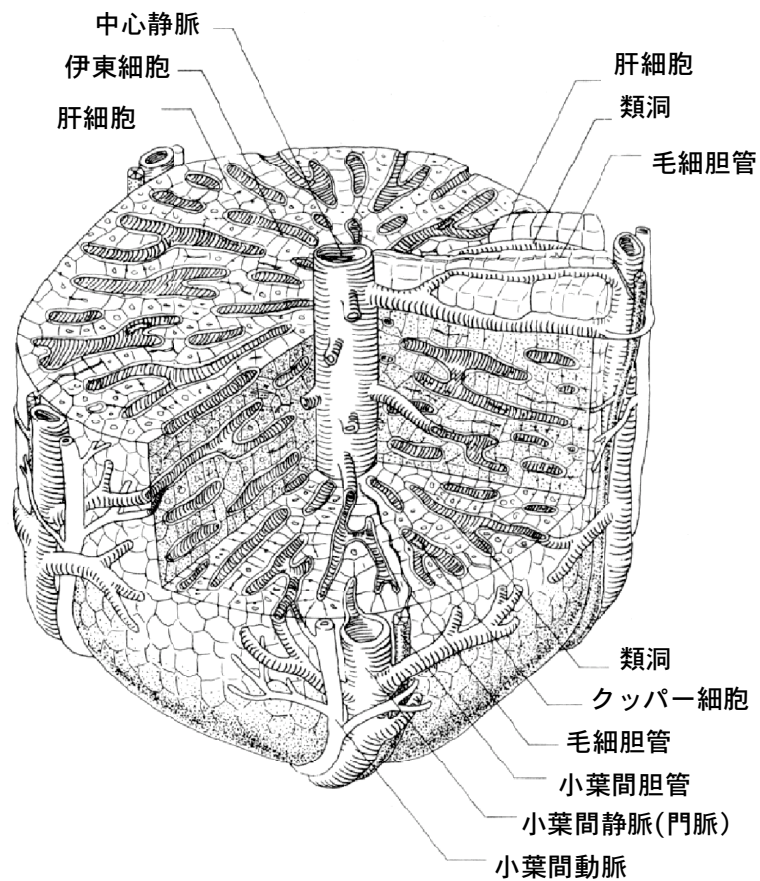


Figure 1-2 . 肝小葉の全体
 (参考文献、水戸廸朗著、沈黙の臓器と語る、
 日本放送出版協会)

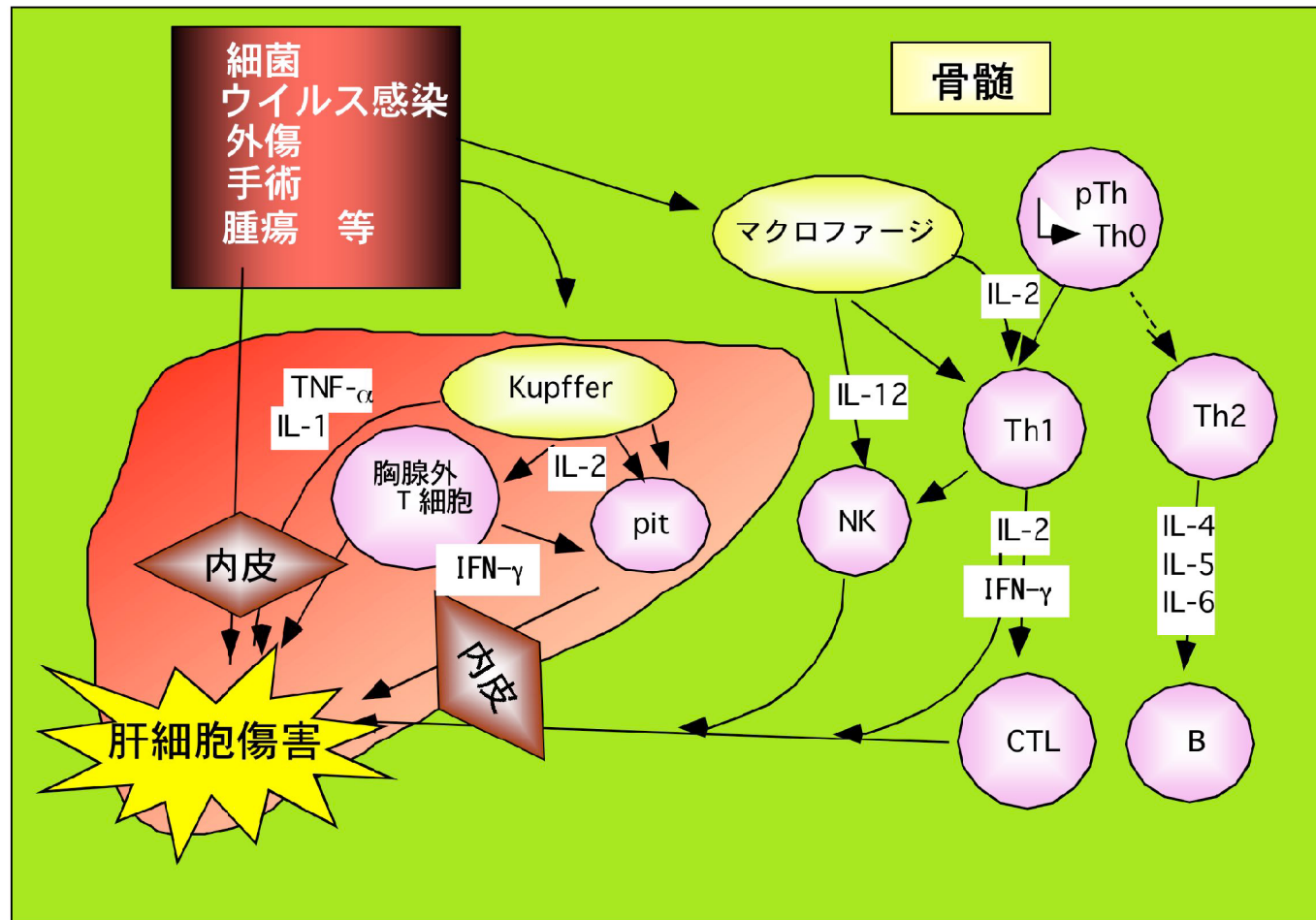


Figure 1-3 肝臓における免疫応答とサイトカインネットワーク

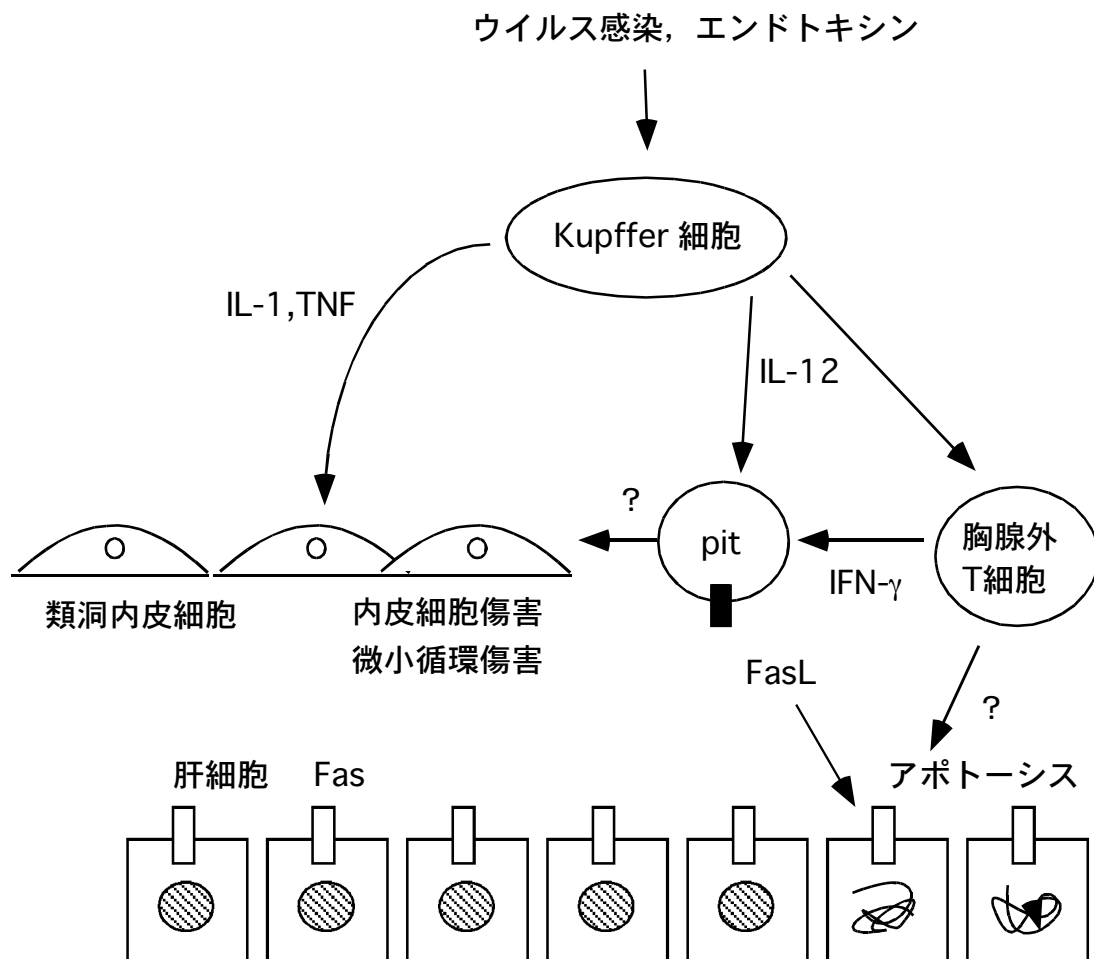


Figure 1-4 . 肝炎の劇症化に関するサイトカインネットワーク

Table1-1. 肝臓で産生されるサイトカインおよび肝臓で代謝されるサイトカイン

肝臓で代謝される サイトカイン	肝臓で産生される サイトカイン	主な産生細胞	肝臓に対する主な作用	肝代謝に対する作用
IL-1	INF- α/β IL-8 IL-1	感染肝細胞, 繊維芽細胞 肝細胞, 繊維芽細胞, 血管内皮細胞 Kupffer細胞 (マクロファージ系細胞) NK細胞, 血管内皮細胞, 繊維芽細胞等	感染ウイルスの増殖抑制 急性蛋白刺激作用 急性蛋白刺激作用	アミノ酸の取り込み, 分解亢進 血清亜鉛濃度低下 脂肪酸, コレステロールの合成亢進 糖新生抑制, 血清銅濃度上昇
TNF- α	TNF- α	Kupffer細胞 (マクロファージ系細胞) 感染肝細胞	急性蛋白刺激作用	アミノ酸の取り込み, 分解亢進 脂肪酸, コレステロールの合成亢進 血清亜鉛濃度低下
IL-6	IL-6	Kupffer細胞 (マクロファージ系細胞) 繊維芽細胞	急性蛋白刺激作用	アミノ酸の取り込み 糖放出亢進
TGF- β	IL-12 IL-2 TGF- α HGF TGF- β Activin A	Kupffer細胞 (マクロファージ系細胞) T細胞, 胸腺外T細胞 肝細胞, 繊維芽細胞, 単球 Kupffer細胞, 類洞内皮細胞, 伊東細胞 単球, 血小板, 伊東細胞 肝細胞	pit細胞増殖分化刺激 pit細胞増殖刺激 肝細胞増殖促進因子 肝細胞増殖促進因子 肝細胞増殖抑制因子 肝細胞増殖抑制因子	アミノ酸取り込み抑制
IFN- γ EGF		T細胞, 胸腺外T細胞 血管内皮細胞		コレステロールの合成亢進 アミノ酸放出, 糖新生亢進 グリコーゲン合成亢進
IL-3		T細胞		

reference (4)

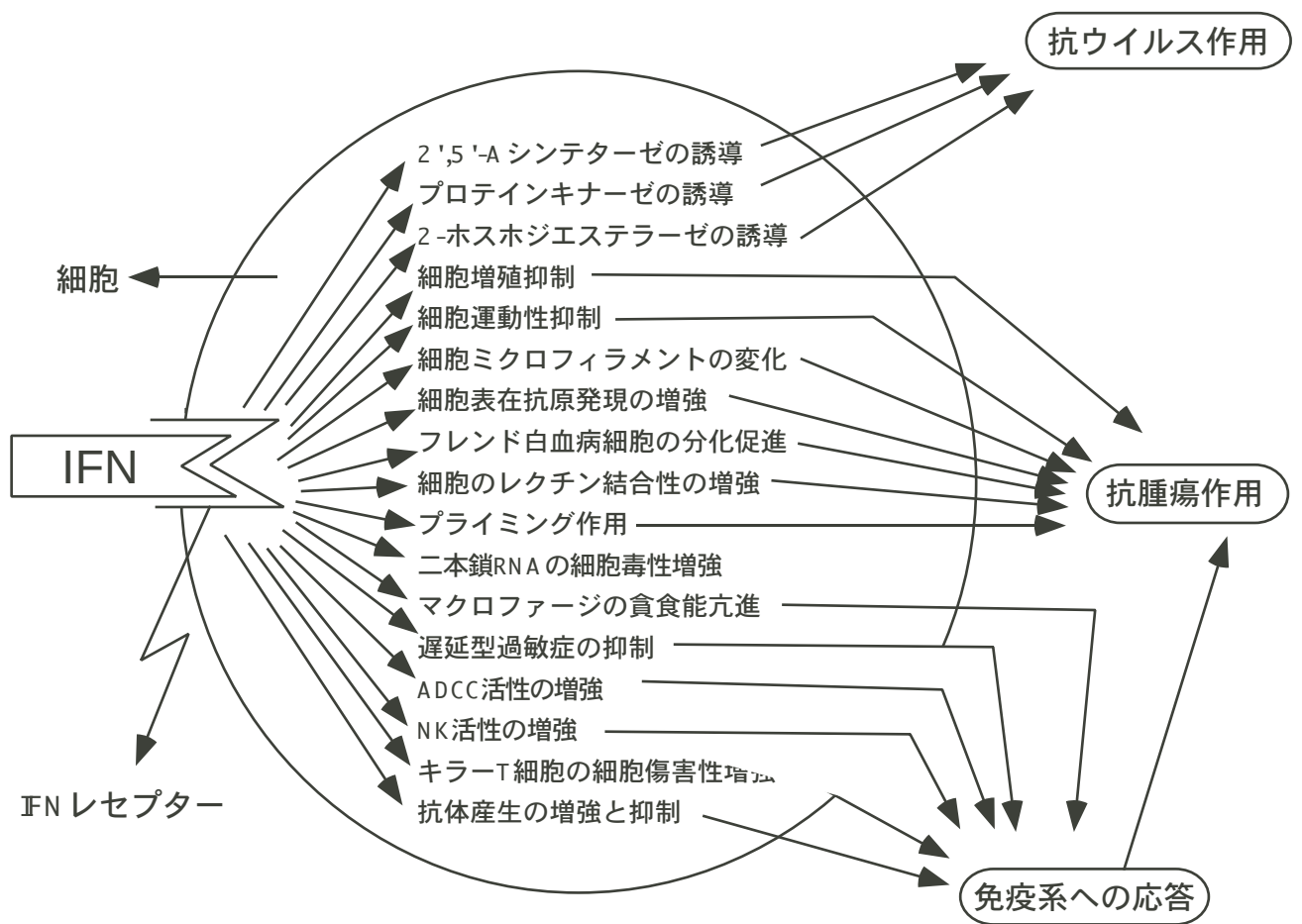


Figure 1-5. インターフェロンの様々な生理作用

Table 1-2. レセプターから見たサイトカインの分類

サイトカインレセプタースーパーファミリー型				チロシン					
β_c	γ_c	gp130	その他	IFN 型	TNF 型	キナーゼ型	TGF- β 型	ケモカイン	Ig 型
IL-3	IL-2	IL-6	G-CSF	IFN- α	TNF- α	M-CSF	TGF- β 1	IL-8	IL-1
GM-CSF	IL-15	IL-11	EPO	IFN- β	TNF- β	SCF	TGF- β 2	MCP-1	
IL-5	IL-4	CNTF	TPO	IFN- γ	FASL	Flk2	TGF- β 3	MIP1 α	
	IL-13	OS	IL-12	IL-10	CD40L	EGF	アクチビン	MIP1 β	
	IL-7	IL-11	PRL			PDGF	BMPs	PF4	
	IL-9		G			NGF			
			H			FGF			
						VEGF			

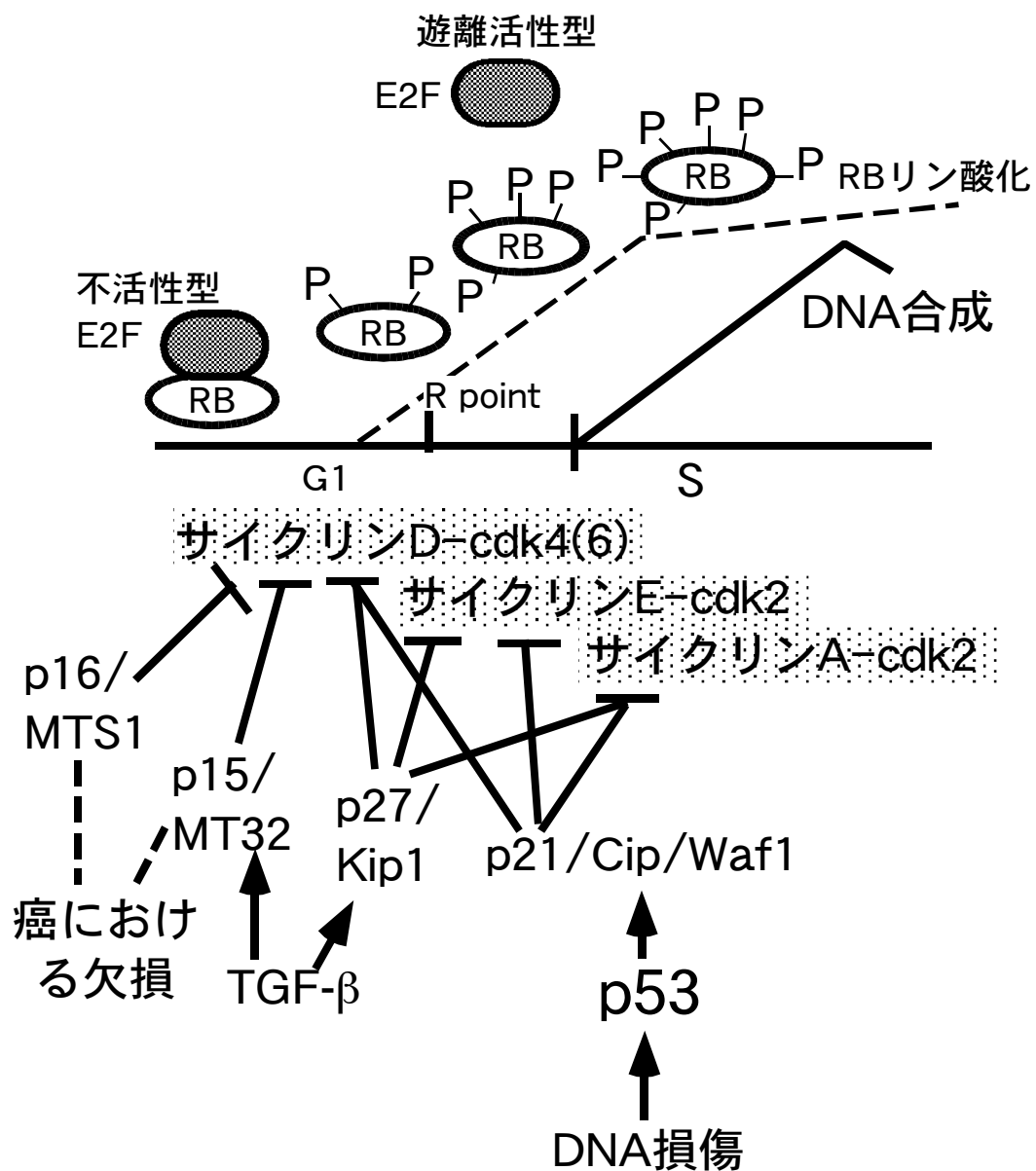


Figure 1-6. サイクリン-cdk によるRB蛋白質のリン酸化とG1/S進行の制御機構

第二章

初代培養肝細胞の増殖活性、及びIFN- γ によるその
DNA合成の阻害と細胞障害性の解析

2-1 緒言

肝臓は高度な分化機能を有しながらも、部分肝切除後の肝再生に代表される旺盛な増殖力を持った臓器である⁽⁶²⁻⁶⁵⁾。しかしながら、培養肝細胞の継代は事実上不可能であり、肝臓研究者の長年の課題であり夢でもありながら、肝再生因子 (hepatocytes growth factor : HGF) の発見⁽⁶⁶⁾ など成果はあったものの、いまだに初代培養肝細胞の増殖は実現できていない。ただし、血清やEGF、HGFなどの刺激により DNA 合成の著しい増加が観察されており^(66, 67)、この活性を指標にした研究は数多い。今後は近年の細胞周期研究の成果を受けた肝細胞の研究が必要と思われる。

IFN- γ は抗ウイルス活性を有し、免疫機能の活性化も含めた生体防御機能の役割を担う。それ故にIFN- γ のレセプターはほとんどの細胞に存在し、IFN- γ は様々な細胞に何らかの作用をするものと思われる。しかしながら、逆に細胞ごとにIFN- γ の活性の表現型は大きく異なり、細胞に対し、増殖を誘導するものもあれば、逆に増殖を阻害する場合もある。この特徴はサイトカイン一般に当てはまるものであり、複数の細胞内伝達系路を使っている証拠とみなされている。また、IFN- γ に関してはそのレセプター数の違いによっても全く逆の性質が現れてくることが報告されている^(15, 16)。

そこでこの章ではマウスの初代培養肝細胞のDNA合成活性について解析し、そのうえでIFN- γ の初代培養肝細胞に対する影響とその作用機序について検討した。

2-2 試薬と実験方法

2-2-1 試薬

Recombinant mouse Interferon- γ (IFN- γ) は Genzyme (Cambridge, USA) から購入した。Recombinant human epidermal growth factor (EGF) は日立化成より供与を受けた。Recombinant human insulin は Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。Collagen type I は Kawasumi Laboratories Inc. (Tokyo, Japan) より供与された。テトラポリペプチド Ac-YVAD-cho は BACHEM Bioscience Inc. (King of Prussia, USA) から購入した。Ac-DEVD-cho と Z-Asp-CH₂-DCB はペプチド研究所 (Osaka, Japan) から購入した。

2-2-2 肝細胞の単離と培養

Seglen らのコラゲナーゼ灌流法に準じ、その変法にて肝細胞を分離した⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾。また、Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いた密度勾配法によって 98 % 以上の高い生存率の肝細胞を単離した。以下に実験操作を示す。

- 1) 麻酔したマウスを固定し、心臓下大静脈と門脈、肝臓下大静脈を露出させる。
- 2) 心臓下大静脈にカニュレーションを行う。
- 3) 門脈を切断後、カニュレを通じて肝臓内に前灌流液 (0.5 mM EGTA, 5 mM Glucose-Hanks solution, pH 7.2) を流す。

- 4) 肝臓下大静脈を切断し、肝臓内の血液をある程度除去した後、鉗子を使って肝臓下大静脈の切断箇所を止める。
- 5) 前灌流液を十分に流し、肝臓内の血液をすべて除いた後、コラゲナーゼ溶液 (5 mM CaCl_2 , 0.015 % Collagenase, 0.005 % Trypsin inhibitor - Hanks solution, pH 7.5) を流す。
- 6) コラゲナーゼによって肝臓組織が十分に消化されたら、肝臓を取り出し、メスを使ってHanks溶液中で細胞を分散させ、ナイロンメッシュでdebrisを除く。
- 7) 50 x g, 90 sec の低速遠心によって細胞を集め、上清を除き、再びHanks溶液に懸濁する。この操作を1回の洗浄とし、4回以上行う。
- 8) 低速遠心の後、Percoll : 2 x Hanks = 1 : 1 ($d = 1.07$) の溶液に細胞を懸濁し、50 x g, 10 min の遠心を行う。生細胞は底に沈む。

得られた肝細胞は Williams'E medium (0.1% BSA, 50 $\mu\text{g/ml}$ penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 100 $\mu\text{g/ml}$ neomycin) に懸濁し、あらかじめコラーゲンコートしたプレートに2.5 万 cells / cm^2 に播種した。37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 の条件下で約3時間インキュベートし、肝細胞を接着させたのち、培地を交換して実験に供した。

2-2-3 肝細胞 DNA 合成活性の測定

肝細胞の DNA 合成は 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 % 血清によって誘導した。この条件にて肝細胞の DNA 合成は無血清、無ホルモンのときに比べて10倍以上に増加した。以下この条件を growth condition とする。肝細胞のDNA合成能は BrdU Labeling and Detection kit III (Boehringer Mannheim

Biochemica) を使用し、Bromodeoxy Uridinの取り込み量をキットの説明書に従い ELISA 法により測定することで見積もった⁽⁷²⁾。

2-2-4 肝細胞の Lactose Dehydrogenase 放出量の測定

Lactose Dehydrogenase (LDH) は細胞質内に存在する安定した酵素であり、細胞が障害を受けたときに細胞外に放出されることから、培養上清中のその活性は細胞障害性を表す指標の一つになっている⁽⁷³⁾。肝細胞の LDH 放出量の測定は CytoTox 96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega) を使用して測定した。Lysis (%) は以下のように算出した。

$$\% \text{LDH release} = 100 \times \text{Experimental release} / \text{Maximum release}$$

Maximum release は細胞を -85 °C にて 30 分凍結後、37 °C にて 15 分インキュベートして調製した。

2-2-5 肝細胞の DNA fragmentation の観察

肝細胞の染色体 DNA の fragmentation の観察のために肝細胞から染色体 DNA を単離し、アガロースゲルにて電気泳動を行った。肝細胞は、DNA 抽出バッファー (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 1 % SDS, 200 µg/ml proteinase K) で溶解し、55 °C で 1 時間インキュベート後 37 °C で 16 時間インキュベートした。つづいてフェノール - クロロホルム抽出、エタノール沈殿にて染

染色体 DNA を調製した。得られた DNA は 1 μ g/ml ethidium bromideを含む 1 % アガロースゲルにて電気泳動を行った。

2-2-6 単離肝細胞核のフローサイトメトリーによる細胞周期の測定と核の断片化の同定

肝細胞は、0.1 M クエン酸、1 % Triton X-100、に懸濁し、1 分間 vortex を行い、2 分間、750 x g にて遠心して単離核を得た。得られた核は、50 μ g/ml propidium iodide (PI) - PBSに懸濁後、室温で 15 min インキュベートし、フローサイトメトリー（日本分光；Cyto ACE-150）にて測定した。

2-3 結果

2-3-1 初代培養肝細胞の DNA 合成活性

初代培養肝細胞を 10 ng/ml EGF, 100 nM Insulin, 5 % EGF で刺激し、DNA 合成の経時的変化を観察した。その結果、肝細胞の DNA 合成は刺激後 36 時間後から増加しはじめ、48 時間後にピークに達し（Figure 2-1）、そしてその後徐々に低下した。初代培養肝細胞の DNA 複製の開始は遅く、一般に培養開始後 48 時間前後が DNA 合成のピークであることが報告されている^(68, 74-77)。その理由として、肝細胞は in vivo では分化した状態でありいわゆる G0 期の状態にあるが、単離後 G0 期から脱し、G1 期に移行するのに培養基質面への接着、進展などの段階を経る

必要があるためと考えられている。本研究はこれらの報告と一致し、この結果を踏まえ、以後 24 時間後から 48 時間後の DNA 合成を観察することとした。

2-3-2 IFN- γ による肝細胞の DNA 合成阻害と障害性の検討

いろいろな濃度の IFN- γ 存在下で肝細胞を培養した結果、10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 % EGF (growth condition) で誘導される肝細胞の DNA 合成は濃度依存的に IFN- γ によって抑制され、100 U/ml でほぼ完全に肝細胞の DNA 合成は阻害された。(Figure 2-2)。

IFN- γ の初代培養肝細胞に対する障害性は LDH release を測定することで検討した。IFN- γ を 100 U/ml の濃度に添加して経時的に肝細胞の LDH release を測定した結果、growth condition では 48 時間過ぎから LDH release が急激に増加した (Figure 2-3)。また、無血清、無ホルモンの条件では、growth condition に比べて極めて早く LDH release が IFN- γ によって誘導され、72 時間後には LDH release はほぼ 100 % に達した (Figure 2-3)。また LDH release は、顕微鏡観察下で判断される死細胞相と一致していた。この結果により IFN- γ は無血清、無ホルモンではすみやかにそしてほぼすべての肝細胞に細胞死を誘導し、また、growth condition においても刺激後 48 時間経過以降に強力に細胞死を誘導することが明らかとなった。また、無血清の条件で肝細胞の細胞密度を変えて IFN- γ の傷害性について検討した結果、細胞密度が低いと IFN- γ による傷害性が弱いことが明らかとなった (Figure 2-4)。

ここまでを示した IFN- γ による肝細胞の DNA 合成阻害と growth condition での細胞死の誘導を比較した結果、細胞死の誘導が 48 時間過ぎに急激に起こるの対

し、DNA の合成阻害は 36 時間までの間に最も強く起きていることが確認できた (Figure 2-5)。

以上の結果より IFN- γ はまず肝細胞の細胞周期を停止させ、それに引き続いて肝細胞を細胞死へと誘導することが明らかとなった。

2-3-3 フローサイトメトリーによる単離肝細胞核の DNA 含量の解析と IFN- γ の影響の検討

次に IFN- γ によって肝細胞の細胞周期が停止していることをさらに確認するために、核を単離し PI 染色によるフローサイトメトリーの測定を行った (Figure 2-6)。横軸に蛍光強度、縦軸に細胞の形と大きさを反映する forward-scatter をとった結果、単離直後の肝細胞の核では 2 倍体、4 倍体、8 倍体のそれぞれ均一な集団が観察され、*in vivo* の静止期 (G0 期) を反映した結果であると考えられた。しかしながら、10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 % 血清の条件で 48 時間肝細胞を培養した結果、forward-scatter はかなり大きなばらつきを示した。顕微鏡観察の結果、これはコラーゲンコートプレート上で培養することによって肝細胞が接着進展するとともに、核も扁平な形に変化してしまったことによるものであることが判明した (data not shown)。また肝細胞の核は約 60 % が 4 倍体であり、この 4 倍体も増殖期に入り 8 倍体を生じることは良く知られている^(78, 79)。

フローサイトメトリーによる測定の結果を Table 2-1 にまとめた。10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 % 血清の条件で 48 時間肝細胞を培養した結果、単離直後に比べて 2 倍体は約 4 % 減少し、4 倍体は約 6 % 減少し、8 倍体は約 10 % 増加した。これは、4 倍体は 8 倍体に、2 倍体は 4 倍体に核の DNA 含量が増加した結

果であると推測できる。それに対し、100 U/ml の IFN- γ 存在下で培養した場合には、4 倍体は約 13 % 減少し、8 倍体は約 8 % 増加しているが、2 倍体は変化していない。また、2 倍体よりも DNA 量が少なく、細胞死を起こした結果核が断片化したものと考えられる集団が、全体に対し約 5 % を占めるにいたっている。この値は control に比べて顕著な違いとなっており、LDH release とも関連していると考えられる。これは 2 倍体に変化していなく、8 倍体の増加率も control とほぼ変わらないことから 4 倍体が断片化したものと推測できる。ただしいずれの集団も 72 時間後には断片化したものになった (data not shown)。

以上の結果より、IFN- γ は特に 2 倍体の肝細胞の細胞周期を完全に停止させ、4 倍体の肝細胞は比較的すみやかに細胞死が誘導されるものであることが推測できた。

2-3-4 IFN- γ による肝細胞の DNA 合成阻害の kinetic analysis

IFN- γ を添加する時間を変えたときの肝細胞の DNA 合成阻害に対する影響を検討した (Figure 2-7)。IFN- γ を添加する時間を最大 24 時間まで遅らせ、24 時間から 48 時間までの BrdU の取り込み量を測定した結果、12 時間遅らせただけでは肝細胞の DNA 合成阻害に大きな影響はなかった。しかし、18 時間後に IFN- γ を添加したときには、その DNA 合成阻害効果は初めから添加したときの半分程度になった。この結果は、IFN- γ に対する感受性が異なる細胞集団が存在することを示唆しており、先のフローサイトメトリーの解析とは違った角度から肝細胞の multi population の存在が示唆された。

2-3-5 IFN- γ によって誘導される肝細胞死の評価

肝細胞はIFN- γ とともに培養することによって細胞が断片化した典型的な apoptotic body の形態変化をともなつて細胞死を起こした (Figure 2-8, A)。また染色体 DNA を単離し、アガロースゲル電気泳動を行った結果、IFN- γ を添加 60 時間後から DNA の断片化が観察された (Figure 2-8, B)。アポトーシスの判断の一つに染色体 DNA の断片化の観察がある。これはアポトーシスの際ヌクレオソーム単位である 180 bp ごとのラダーが染色体 DNA の電気泳動の際に観察されるというものである。ここで観察された DNA の断片化もアポトーシスの指標の一つである DNA ラダーであると考えられる。以上の結果より、IFN- γ によって誘導される肝細胞の細胞死は programmed cell death の一種、アポトーシスであると考えられた。

2-3-6 タンパク合成の特異的阻害剤のIFN- γ によって誘導される肝細胞死への影響

多くのアポトーシスや programmed cell death と言った細胞死はタンパク合成の阻害剤であるシクロヘキシミドによって阻害を受けることが報告されている^(80, 81)。そこでIFN- γ によって誘導される肝細胞死はシクロヘキシミドによって阻害を受けるのかどうかを検討した。10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 % 血清, 100 U/ml IFN- γ の存在下で各濃度のシクロヘキシミドとともに 72 時間肝細胞を培養し、培養上清中のLDH の活性で細胞死を評価した結果、IFN- γ によって誘導される肝細胞死は濃度依存的にシクロヘキシミドによって抑制されることが示された

(Figure 2-9. A) 。続いて control の肝細胞には影響無く、細胞死の抑制に最も効果がある 5 μ g/ml の濃度のシクロヘキシミドを時間を変えて添加した結果、興味深いことに刺激後 24 時間後以降にシクロヘキシミドを添加した場合には、その IFN- γ によって誘導される肝細胞死を抑制する効果はほとんど全く消失した (Figure 2-9. B) 。

以上の結果より、IFN- γ によって誘導される肝細胞死には刺激後 24 時間以内の新たなタンパク合成が必要であることが示された。

2-3-7 IFN- γ によって誘導される肝細胞死への各種特異的阻害剤の影響

IFN- γ は単独でも若干 nitric oxide syntase (NOS) の活性を刺激し、nitric oxide (NO) を誘導することが報告されている⁽⁸²⁻⁸⁴⁾。しかしながら NOS の特異的阻害剤である N^G-monomethyl-L-arginine (NMA) を使用した結果、IFN- γ 処理した肝細胞の LDH release には変化がなかった (Figure 2-10)。NO は IFN- γ と tumor necrosis factor α (TNF- α) とのコンビネーションで強く誘導され、そして細胞死も誘導される。しかしこのときも NMA によって NO の産生は強く阻害されるものの細胞死は抑制されないことが示されている⁽⁸⁵⁾。従って IFN- γ によって誘導される細胞死には NO は関与していないと考えられる。

RNA 合成の阻害剤であるアクチノマイシン D はコントロールの肝細胞に細胞死を強く誘導した。しかしながら 10 ng/ml までの低濃度で IFN- γ による肝細胞死を阻害する傾向がうかがえた。従って IFN- γ による肝細胞死には転写レベルでの新たな発現が必要であることが推測された。

スタウロスポリンは低濃度 (2.7 nM) で protein kinase C (PKC) を特異的に

阻害し、高濃度では非特異的に各種のキナーゼを阻害することが知られている⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾。IFN- γ による肝細胞死は低濃度（10 nM）では全く抑制されなかったが、高濃度では、若干抑制される傾向がうかがえた。高濃度ではIFN- γ レセプター以下のシグナル伝達を阻害することが十分に考えられるが、少なくとも PKC の細胞死に対する関与は無いことが示唆された。

GTP 結合タンパク質の阻害剤である pertussis toxin（PT、百日咳毒素）は肝細胞に対する障害性が極めて強く、IFN- γ による肝細胞死の影響は判別できなかった。

2-3-8 IFN- γ によって誘導される肝細胞死に対するプロテアーゼ阻害剤の影響

CED-3 は線虫の分子遺伝学的解析からアポトーシスに必須の遺伝子として発見された遺伝子であるが⁽⁸⁹⁾、これの相同遺伝子がヒトのプロテアーゼである IL-1 β converting enzyme（ICE）であることが見つかって以来⁽⁹⁰⁾、アポトーシス研究においてプロテアーゼに注目が集まるようになった。そこでIFN- γ によって誘導される肝細胞死に ICE 及びその相同遺伝子として見つかった CPP32 /Yama⁽⁹¹⁻⁹³⁾ が関与しているのかどうかを検討するために、それぞれに特異的な競争阻害剤であるテトラペプチドを使用した。

培養上清中の LDH の活性を指標にして使用した結果、ICE の特異的阻害剤であるテトラペプチド、Ac-YVAD-cho^(94, 95)、及びCPP32 の特異的阻害剤であるテトラペプチド、Ac-DEVD-cho⁽⁹²⁾ではいずれもIFN- γ による肝細胞死を抑制することにはなかった（Figure 2-11. A, B）。これらの阻害剤は、培養液に添加するだけで

Fas mediate なアポトーシスを大きく阻害することが示されてはいる⁽⁹⁶⁾。しかしながらアスパラギン酸を認識するプロテアーゼ全般に阻害効果があると考えられ、従ってICE 様プロテアーゼの阻害剤として使用される Z-Asp-CH₂-DCB^(97, 98)では完全ではないものの濃度依存的にIFN- γ による肝細胞死を阻害することが観察された (Figure 2-11. C)。これらの結果により、ICE /CED-3 ファミリーのに属する何らかのプロテアーゼがこの細胞死に関与していることが強く示唆され、また Fas 抗原を介するアポトーシスとは異なる機構であると考えられた。

2-3-9 CPP32 の特異的阻害剤 Ac-DEVD-cho のIFN- γ によって誘導される肝細胞死にともなう形態変化、及び染色体 DNA の断片化に対する影響

IFN- γ によって誘導される肝細胞死に対する Ac-DEVD-cho の阻害効果を細胞からの LDH release を指標にした場合には、全くその影響は検出できなかった。しかしながら興味深いことに、Ac-DEVD-cho はこの肝細胞死にともなう形態変化に対して顕著な影響を示した。Ac-DEVD-cho は濃度依存的にIFN- γ による肝細胞死にともなう apoptotic body の出現を抑え、肝細胞は培養基質へ接着進展した形態を維持していた (Figure 2-12)。次に、この結果を踏まえて染色体 DNA の断片化に対する影響を検討した結果、Ac-DEVD-cho の濃度に依存して若干断片化が阻害された。(Figure 2-13)。以上の結果より、IFN- γ によって誘導される肝細胞死において、CPP32 様のプロテアーゼが、apoptotic body への変化などの形態変化や、DNA の断片化に関与していることが推測された。

2-3-10 マウス肝癌細胞 Hepa 1-6 に対するIFN- γ の影響

IFN- γ が株化された肝癌細胞に対しても DNA 合成を抑制し、細胞死を誘導するのかをマウス肝癌細胞 Hepa 1-6 の BrdU の取り込みとLDH release を観察することによって検討した。各濃度のIFN- γ 存在下で Hepa 1-6 を 24 時間培養し、20 - 24 時間の BrdU 取り込み量を測定した結果、IFN- γ による影響は全く観察されなかった (Figure 2-14. A) 。一方、IFN- γ の濃度に依存してHepa 1-6 の LDH release は増加した (Figure 2-14. B) 。これらの結果は、IFN- γ は Hepa 1-6 に対しDNA 合成の阻害はしないが、細胞死を誘導することを示している。しかしながら、LDH release の測定は無血清の条件で行われた。無血清により Hepa 1-6 の生存に必要ないわゆるsurvival factor の枯渇や細胞周期の停止が起きていることが推測される。

2-4 考察

IFN- γ は 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 %FBS によって誘導される初代培養肝細胞の DNA 合成を抑制し、100 U/ml の濃度でほぼ完全に阻害した。またこれに引き続いて細胞死を誘導し、最終的にはほぼすべての細胞が死滅した。この初代培養肝細胞で観察される劇的な IFN- γ の活性は、他の細胞では報告がない。初代培養系では正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) ⁽¹⁶⁾、株化細胞では Hela 細胞 ⁽¹⁷⁻²¹⁾ などで報告されているが、いずれも 4 日から 10 日間程度の培養を必要としている。また肝癌細胞である Hepa 1-6 細胞でもその細胞障害活性は弱く、DNA 合成の抑制にいたっては全く観察されなかった。この IFN- γ の活性は初代培養肝細胞故のものなのであろうか？ また何故そのような違いが生じるのであろうか？ 答えの一つはやはり、DNA 合成の違いに観て取れると思われる。Hepa 1-6 の DNA 合成活性は極めて高いの対し、初代培養肝細胞のそれは非常に弱く、遅い。また肝細胞は *in vivo* ではほとんどが静止期である G0 期にあると考えられ、*in vitro* で培養することにより初めてそして一斉に G1 期に移行するものと思われる。つまり、細胞周期が同調していると考えられる。G1 期での停止が細胞死に必須であるか否かは現段階では判断できないが、Hepa 1-6 も細胞周期のどこかで (G1 期であろうと推測はするが) 停止させ、そして細胞周期を同調させることによって IFN- γ の活性も強く現れるのではないだろうか。初代培養肝細胞も無血清で培養することによって、よりすみやかに IFN- γ によって細胞死が誘導された。無血清ではほとんど DNA 合成が起きないことと関係していると推測できる。また、細胞密度が高いほど IFN- γ による肝細胞の細胞死誘導活性が高いことが観察された。細胞を低密度にま

き、細胞同士の接触がない状態でも細胞死が起きている様子が観察されたことから (data not shown)、細胞死に細胞間接触が必要であるとは考えにくい。おそらく、細胞密度によって肝細胞の状態が大きく異なる結果であると推測される。例えば、初代培養肝細胞の DNA 合成活性は細胞密度に大きく依存し、密度が高いと DNA 合成活性が低いことが報告されている⁽⁹⁹⁾。

肝細胞の核はおよそ 60 % が 4 倍体であることが知られているが^(78, 79)、分化した細胞に比較的多く見られる状態である。細胞周期の解析においてフローサイトメトリーは、細胞周期の位置の帰属が容易にできるため極めて有効な研究方法となっているが、肝細胞の場合は 4 倍体が多いためにその解析が困難なものとなっている。しかしながら、本研究では IFN- γ の肝細胞への影響を検討する上で、興味深い現象をフローサイトメトリーによる解析から推測することができた。IFN- γ は 2 倍体の肝細胞の DNA 合成をほぼ完全に阻害していた。また 4 倍体の肝細胞の一部は DNA 合成がなされたが、一部には細胞死が誘導され始めていることが推測された。このことは肝細胞の IFN- γ に対する感受性が、各集団ごとに特異的に違うことを意味している。ただしいずれの集団も 72 時間後には細胞死が引き起こされる。また、IFN- γ による DNA 合成阻害において、18 時間後に IFN- γ を添加した場合にその阻害効果が半分程度になることから、細胞集団ごとによる IFN- γ に対する感受性の違いが存在することが推測される。しかしこれは別の角度から IFN- γ に対する感受性の違いを見たものであり、この違いが何に基づく集団として分類されるのか興味を持たれる。ただしいずれにしても IFN- γ への感受性が異なる細胞集団が肝臓内に存在するという事は、IFN- γ が肝細胞に細胞死を誘導する意味を考える上で重要なものであると考えられる。

IFN- γ による肝細胞死のメカニズムを推測するために各種の阻害剤を使用した
が、使用したシグナル伝達系の阻害剤は効果的に肝細胞死を抑制することはなかつ
た。しかし、タンパク合成の特異的阻害剤のシクロヘキシミドはIFN- γ によって誘
導される肝細胞死を大きく抑制した。シクロヘキシミドは 24 時間以降の添加では
全く細胞死の阻害効果を示さなくなることから、IFN- γ 添加後 24 時間以内に発現
するタンパク質の重要性が示された。また、IFN- γ による肝細胞死は形態的な変化
と、染色体 DNA の断片化から、アポトーシスであると考えられた。

最近アポトーシスの研究においてプロテアーゼである ICE / CED-3 ファミリーが
注目されている。アポトーシスは細胞の様相の劇的な変化をともしうことから、プ
ロテアーゼの介在を想定するのは当然であるかもしれない。特に Fas を介したアポ
トーシスでは ICE や CPP32 の特異的阻害剤で劇的にアポトーシスが阻害されるこ
とが報告されている⁽⁹⁶⁾。またIFN- γ 誘導性転写因子、IRF-1 が直接 ICE gene を
活性化することも明らかにされている⁽¹⁰⁰⁾。ICE 及び CPP32 の特異的阻害剤は
IFN- γ による肝細胞死を阻害することはなかった。しかし ICE 様プロテアーゼの阻
害剤によって顕著に肝細胞死が抑制されたことから、何らかの ICE/CED-3 ファミ
リーに属するプロテアーゼが関与していることが強く推測される。またICE 阻害剤
の Ac-YVAD-cho や CPP32 の阻害剤、Ac-DEVD-cho は、単離核を用いたセル
フリーシステムによるアポトーシスの解析で、さらに有効な阻害活性を示している⁽⁹⁶⁾。これは、アポトーシスのシグナルが入った細胞の細胞質成分を別に単離した核
にかけ、このときの核の断片化を解析するというものである。アポトーシスの細胞
内シグナル伝達系を解析する上で、有効な実験方法となっている。IFN- γ による肝
細胞死におけるプロテアーゼの解析にも必要な実験方法であると思われる。

CPP32 の阻害剤であるテトラペプチド、Ac-DEVD-cho も LDH release によって評価される肝細胞死にはほとんど影響を及ぼさなかった。しかしながら、興味深いことにIFN- γ による肝細胞死にともなう形態変化に対して、顕著な阻害効果を示した。Ac-DEVD-cho を添加することによって、肝細胞は接着進展形態を維持し、apoptotic bodyの出現を抑制したのである。グランザイム B による細胞死の解析において、CPP32 は核や DNA の断片化に関与し、細胞膜の破壊には関与していないという報告が最近なされた^(101, 102)。IFN- γ による肝細胞死においては LDH の放出を抑制することはなかったが、形態変化や DNA の断片化を抑制した。アポトーシスは本来、特徴的な形態変化の観察から出てきた概念である。この形態変化を一つのプロテアーゼ阻害剤で抑制できたことは極めて重要な知見であり、今後の研究によって、アポトーシス解析における新たな分子生物学的展開がなされるものと思われる。

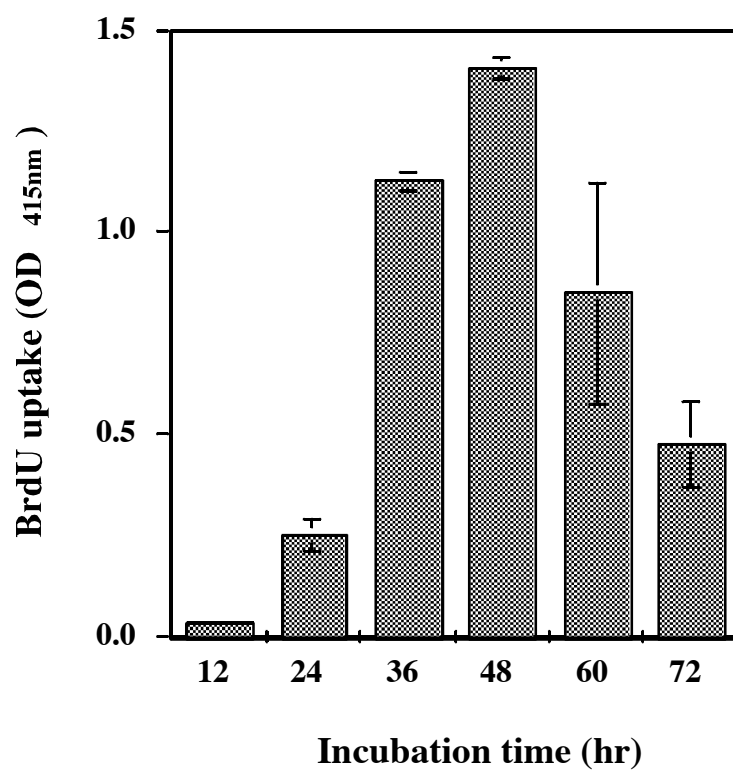


Figure 2-1. Time course of DNA synthesis of mouse hepatocytes in primary culture. Hepatocytes were incubated with 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin and 5% serum. The DNA synthesis was measured by BrdU incorporation at indicated time.

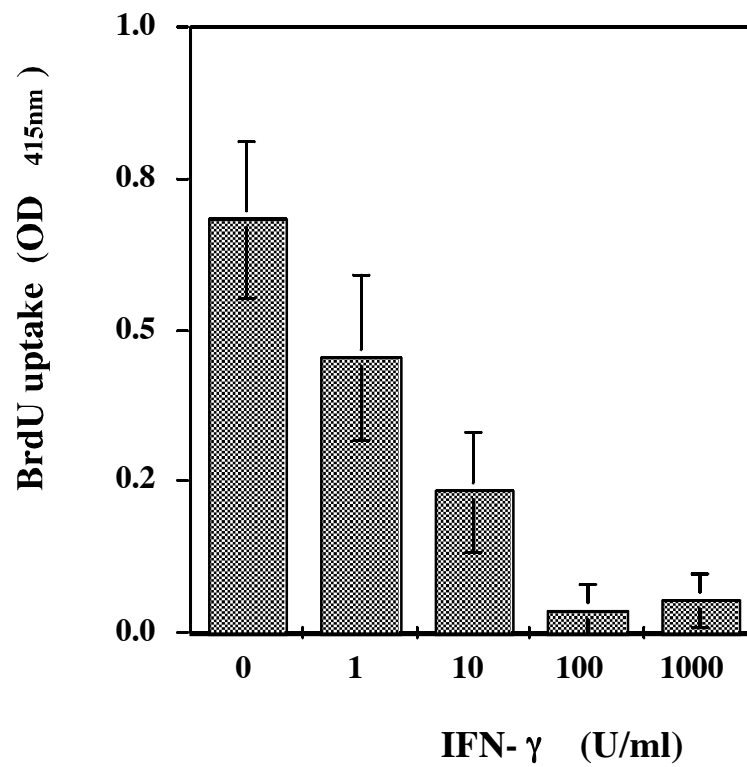


Figure 2-2. Effect of IFN- γ on DNA synthesis of mouse hepatocytes. Hepatocytes were cultured with EGF (10 ng/ml), insulin (100 nM) and serum (5%). Cells were cultured with IFN- γ at various concentration for 48 hrs. BrdU incorporation between 24 to 48 hrs after stimulation was measured.

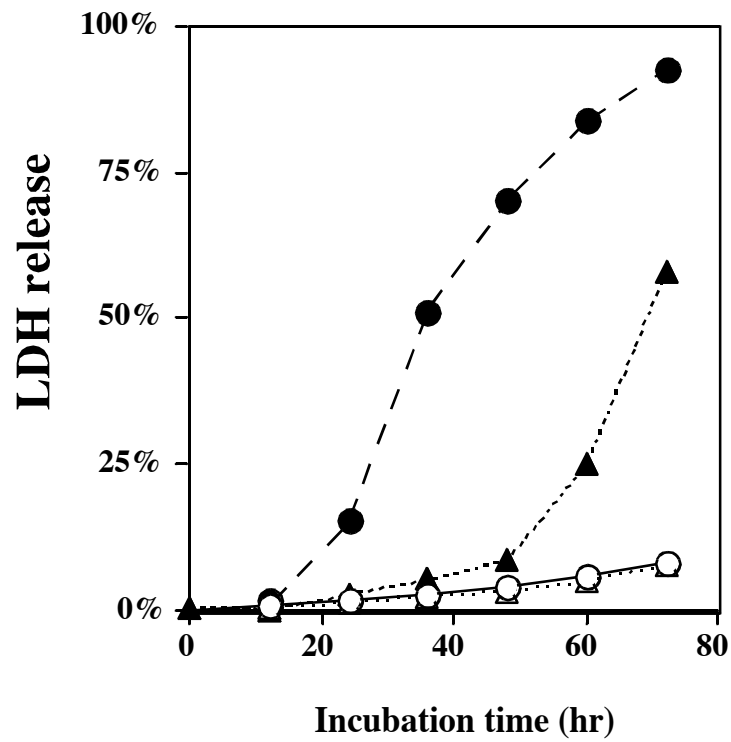


Figure 2-3. Time course of IFN- γ -induced LDH release of hepatocytes. Hepatocytes were incubated without (open symbols) or with (close symbols) 100 U/ml IFN- γ supplemented without (circles) or with (triangles) 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5% serum (growth condition).

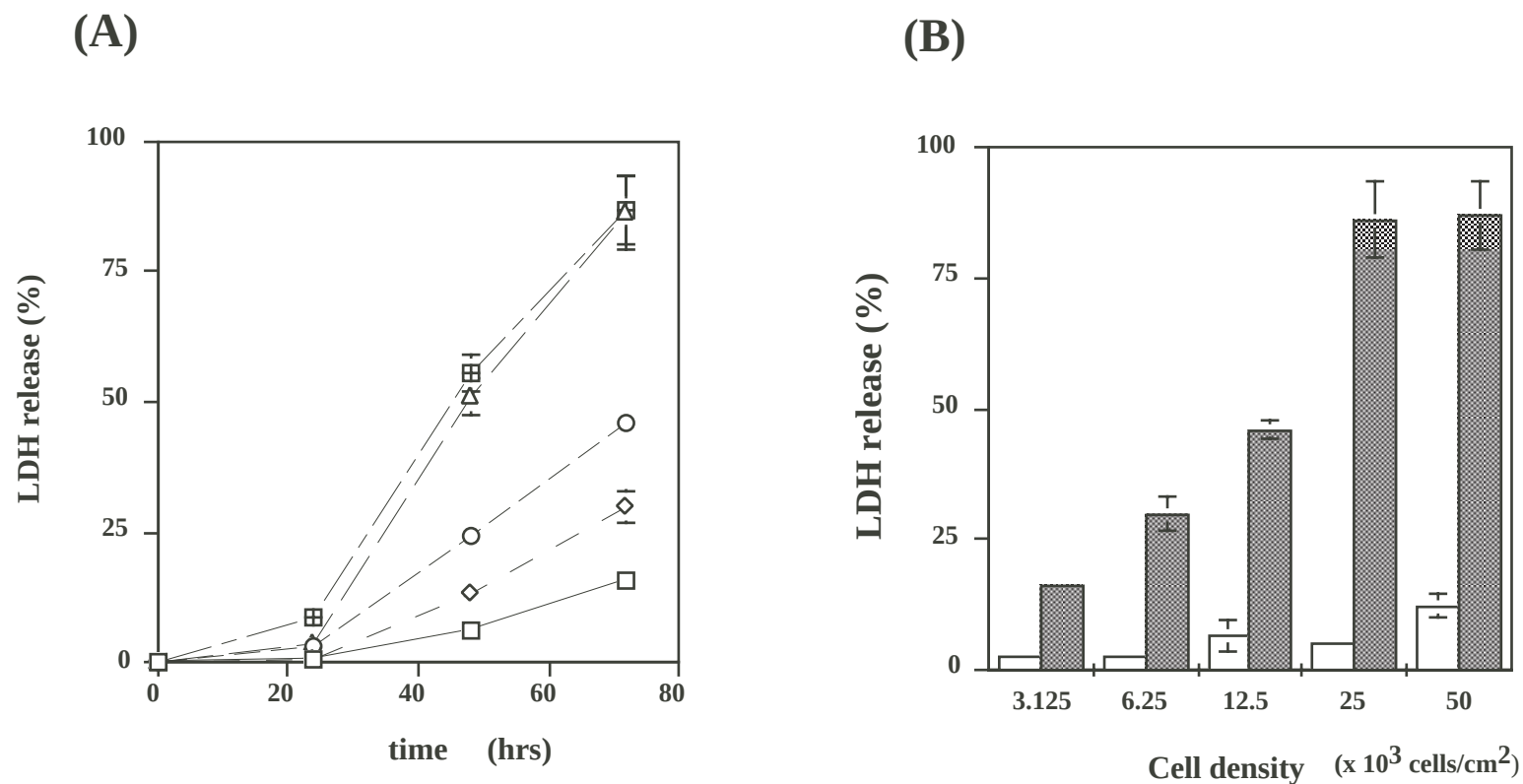


Figure 2-4. Effect of cell density on IFN- γ -induced LDH release of hepatocytes. The LDH activities of the supernatants were measured and expressed as percentage release. (A) Time course analysis of LDH release of hepatocytes. Hepatocytes were cultured with IFN- γ (100 U/ml) and at density of 3.125×10^3 cells/cm² (—□—), 6.25×10^3 cells/cm² (—◇—), 12.5×10^3 cells/cm² (—○—), 25×10^3 cells/cm² (—△—), 50×10^3 cells/cm² (—■—). (B) Hepatocytes were cultured without (open bars) or with (shaded bars) IFN- γ (100 U/ml) for 72 hrs at indicated density.

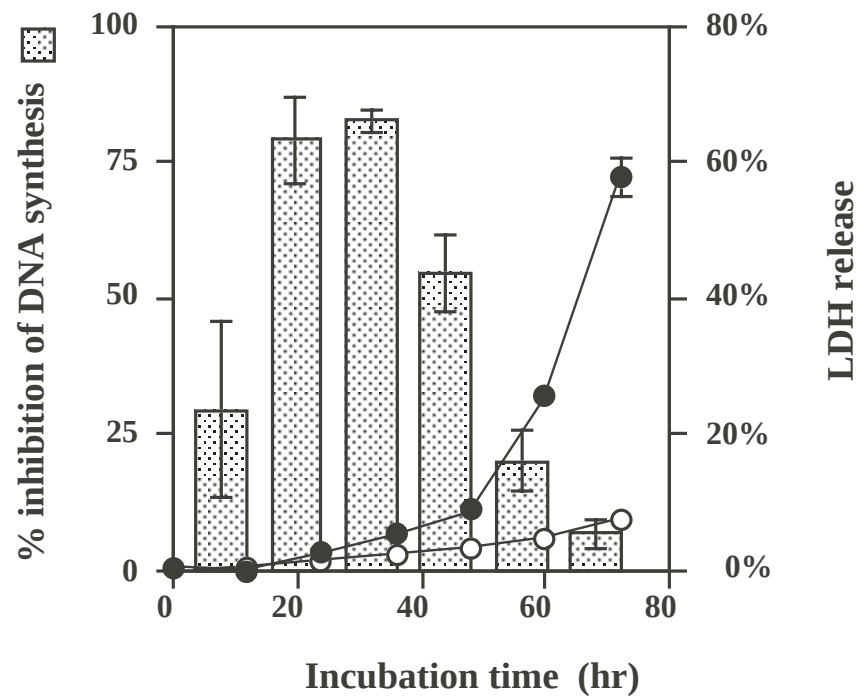


Figure 2-5. Relationship of inhibition of DNA synthesis and induction of cell death by IFN- γ in mouse hepatocytes. Hepatocytes were cultured in the presence of 10 ng/ml EGF, 100 nM Insulin and 5% serum for the desired time then LDH activities in the supernatants and DNA synthesis were measured. Percent inhibition of DNA synthesis was calculated as followed: % inhibition = $100 \times (\text{BrdU incorporation of non-treated control} - \text{BrdU incorporation of IFN-}\gamma\text{-treated samples}) / \text{BrdU incorporation of non-treated control}$. (open circles) control, (closed circles) IFN- γ -treated.

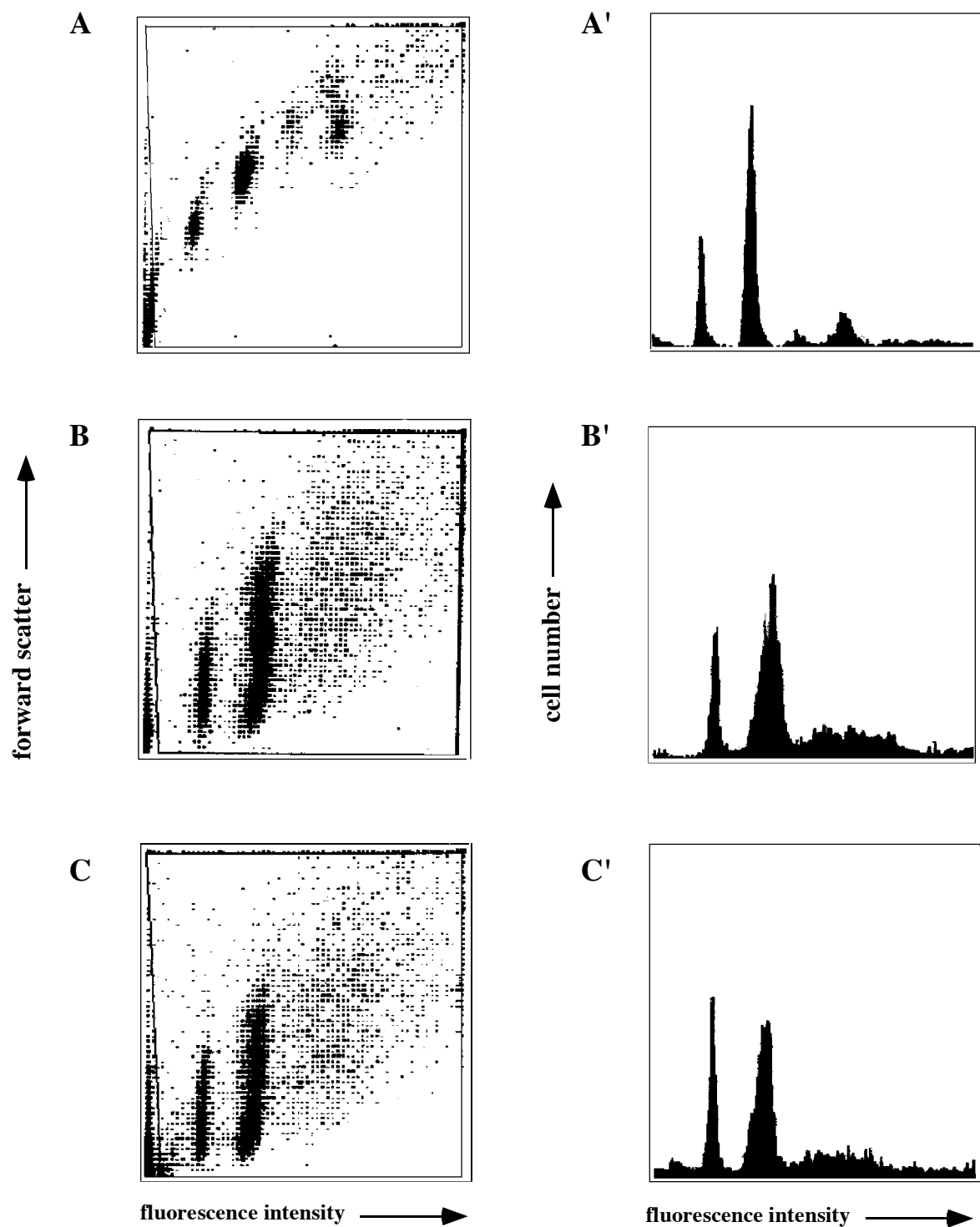


Figure 2-6. Flow cytometric analysis of the nuclei of hepatocytes. The nuclei of hepatocytes were isolated and stained by PI, then flow cytometric analysis was performed. Freshly isolated hepatocytes were indicated in (A). The cells were cultured for 48 hrs with 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 % serum in the absence (B) or presence (C) of 100 U/ml IFN- γ .

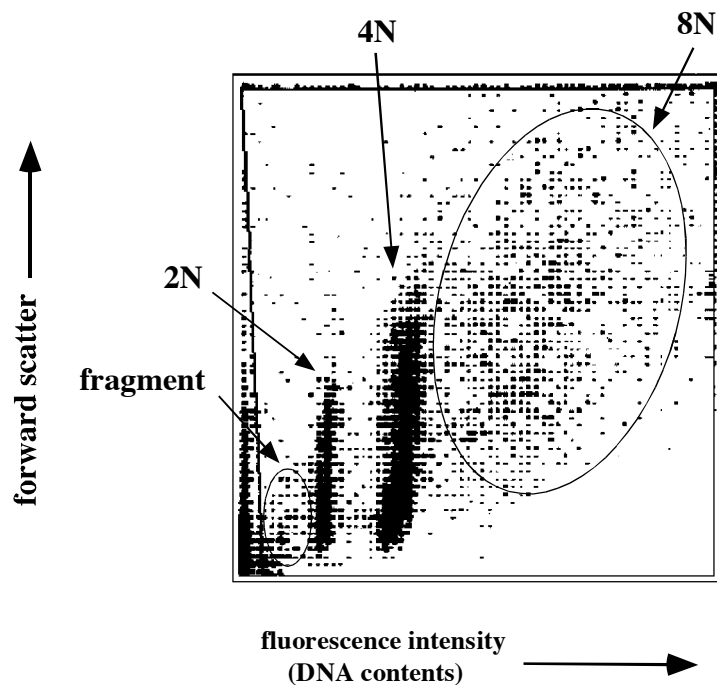


Table 2-1. Comparison of the DNA contents of Hepatocyte Nuclei.

The DNA contents of hepatocyte nuclei were compared as the percentage of nuclear counts.

	2 N %	4 N %	8 N %	fragment %
freshly isolated	20.9%	57.7%	21.0%	0.0%
culture 48h control	16.9%	51.5%	30.5%	0.8%
culture 48h IFN- γ	20.3%	44.8%	29.3%	5.4%

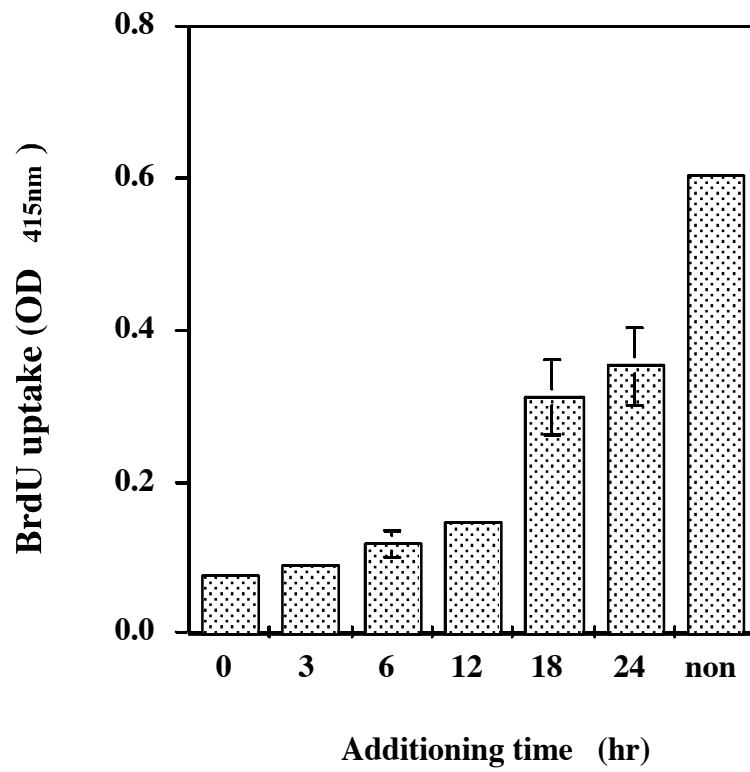


Figure 2-7. Kinetic analysis of the inhibitory effect of IFN- γ on DNA synthesis of mouse hepatocytes. Hepatocytes were incubated with 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5% serum and then 100 U/ml IFN- γ was added at indicated time. The cells were cultured for 48 hrs and BrdU incorporation between 24 to 48 hrs was measured.

A



B

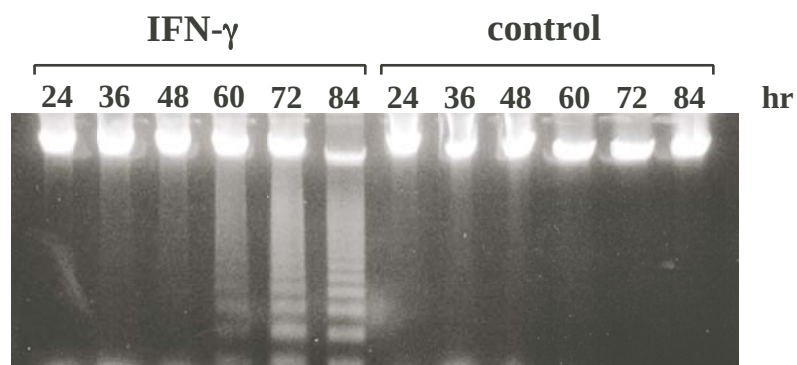


Figure 2-8. Cell death induced by IFN- γ in mouse hepatocytes was accompanied by apoptotic characteristics. (A) Hepatocytes were cultured with IFN- γ (100 U/ml) for 48hrs. The morphological changes were observed by microscope. Magnification ; x 200. (B) Hepatocytes were cultured with IFN- γ (100 U/ml), 10ng/ml EGF, 100 nM Insulin, and 5 % serum for the desired time, then the same amount of DNA from each sample was subjected to electrophoresis through 1.0 % agarose gel.

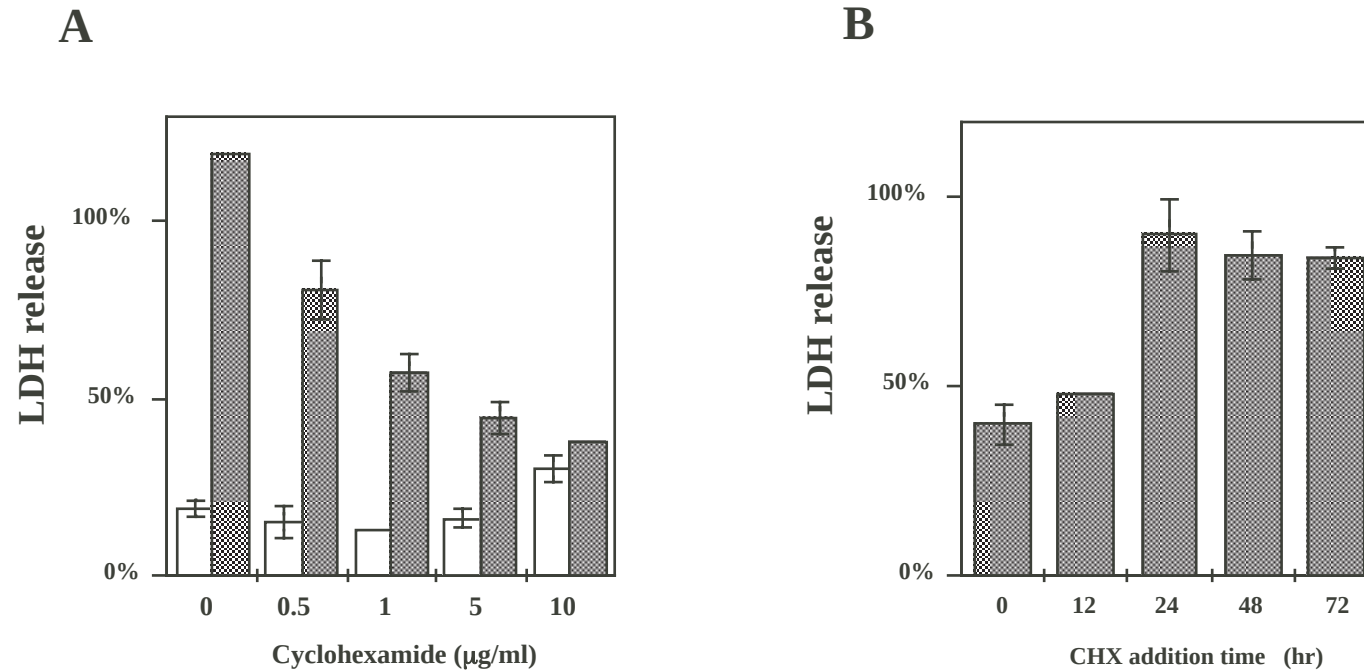


Figure 2-9. Cycloheximide inhibited IFN- γ -induced cell death in hepatocytes. Hepatocytes were cultured with IFN- γ (100 U/ml) in the presence of cycloheximide. The LDH activities in the supernatants were measured after the incubation. (A) Dose-dependent inhibition by cycloheximide of IFN- γ -induced apoptosis in hepatocytes. Cells were cultured for 72 hrs with IFN- γ and cycloheximide at various concentrations. (Open bar) control (Shaded bar) IFN- γ -treated. (B) Time-course analysis of the inhibitory effect of cycloheximide on IFN- γ -induced apoptosis in hepatocytes. Cycloheximide (5µg/ml) was added at the described time following the addition of IFN- γ . The supernatants were collected at the end of the culture (72hrs), then the LDH activities in the supernatants were measured.

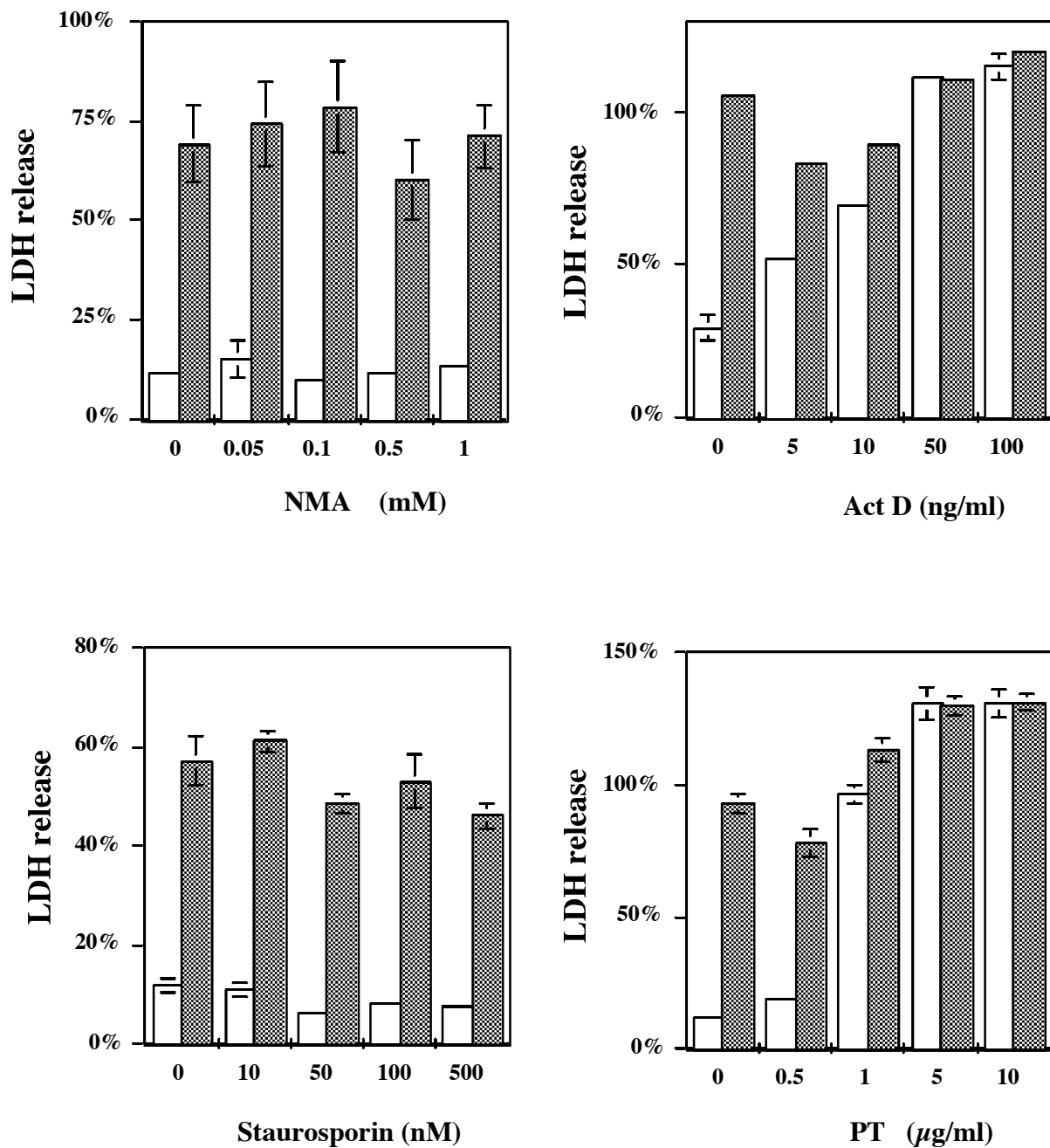


Figure 2-10. Effect of NO syntase inhibitor (N^G-monomethyl-L-arginine : NMA), translational inhibitor (actinomycin D : ActD), protein kinase inhibitor (staurosporin) and GTP binding protein inhibitor (pertussis toxin : PT) on IFN- γ -induced hepatocytes cell death. Hepatocytes were cultured without (open bars) or with (shaded bars) 100 U/ml IFN- γ . Each inhibitor was added at indicated concentration. The LDH activities of the supernatants were measured and expressed as percentage release.

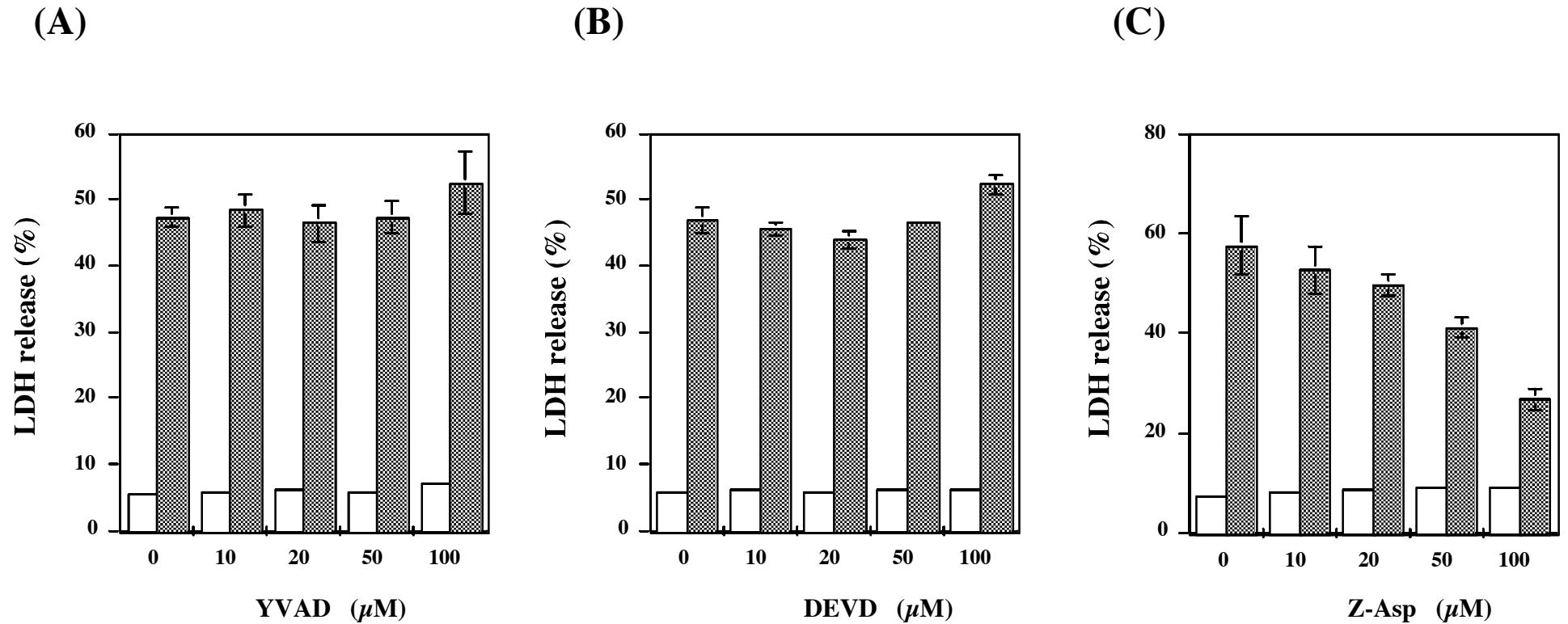


Figure 2-11. Effect of ICE inhibitor, CPP32 inhibitor and ICE-like protease inhibitor on IFN- γ -induced of hepatocyte cell death. Hepatocytes were cultured for 48 hrs without (open bars) or with (shaded bars) 100 U/ml IFN- γ , and in the presence of the indicated concentration of ICE inhibitor, Ac-YVAD-cho (A), CPP32 inhibitor, Ac-DEVD-cho (B), ICE-like protease inhibitor, Z-Asp-CH₂-DCB (C). The LDH activities of the supernatants were measured and expressed as percentage release.

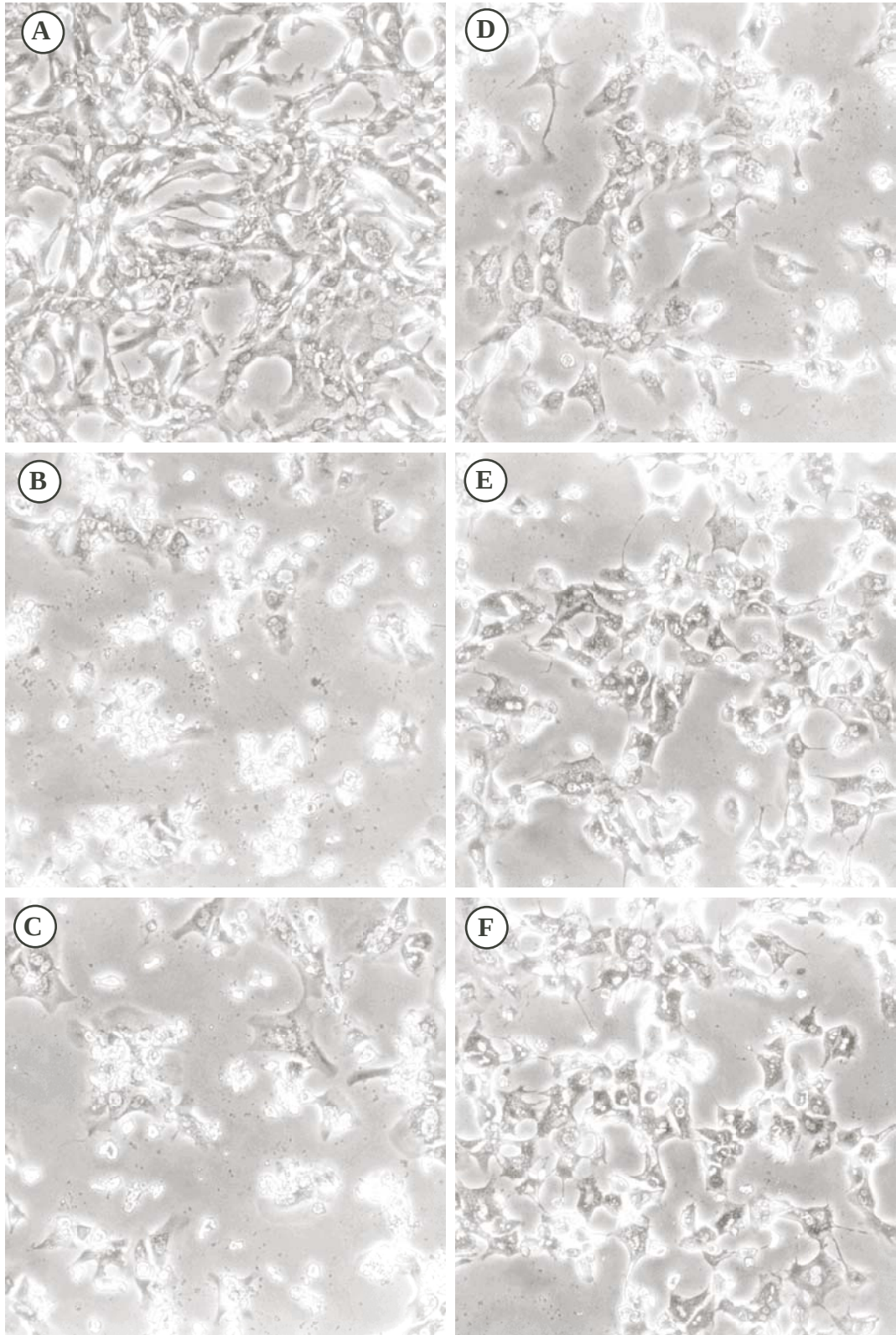
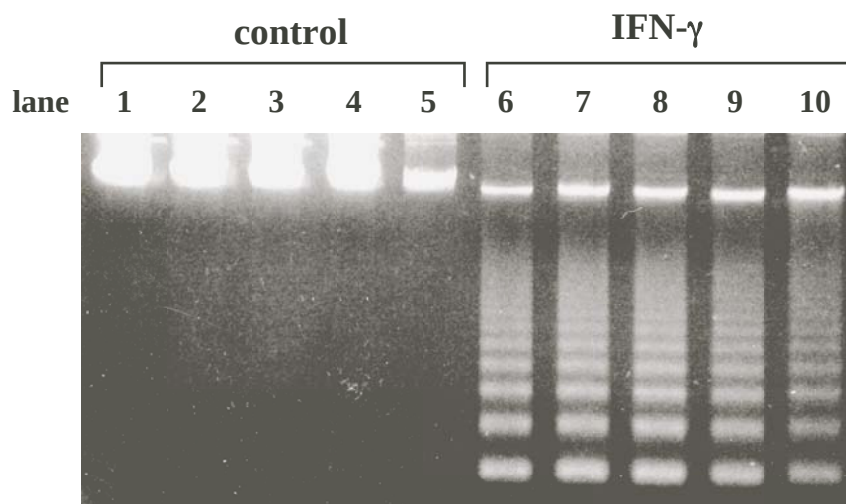


Figure 2-12. Effect of Ac-DEVD-cho on morphological changes of hepatocytes. Hepatocytes were cultured for 72 hrs with 10 ng/ml EGF, 100 nM Insulin, 5 % serum and without (A) or with (B - F) 100 U/ml IFN- γ . CPP32 inhibitor, Ac-DEVD-cho was absent (B) and present in the concentration of 10 μ M (C), 20 μ M (D), 50 μ M (E), 100 μ M (F).



lane 1, 6.	Ac-DEVD-cho	0 μ M
lane 2, 7.		10 μ M
lane 3, 8.		20 μ M
lane 4, 9.		50 μ M
lane 5, 10.		100 μ M

Figure 2-13. Effect of Ac-DEVD-cho on fragmentation of chromosome DNA in hepatocytes. Hepatocytes were cultured for 72 hrs with 10 ng/ml EGF, 100 nM Insulin, 5 % serum and without (lane 1 - 5) or with (lane 6 - 10) 100 U/ml IFN- γ . CPP32 inhibitor, Ac-DEVD-cho was present in indicated concentration.

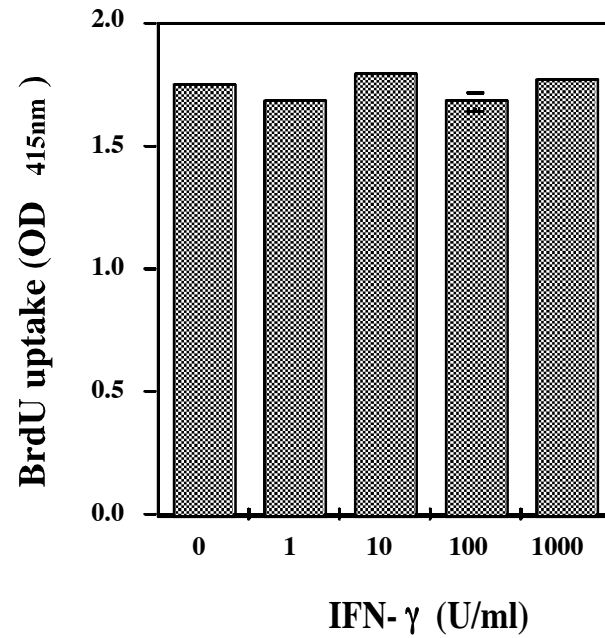
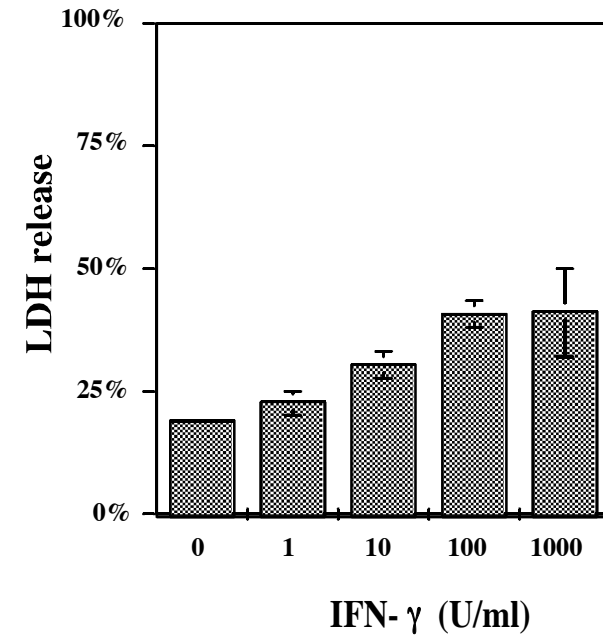
A**B**

Figure 2-14. Effect of IFN- γ on DNA synthesis and LDH release of Hepa1-6. The cells were cultured for 24 hrs with indicated concentration of IFN- γ . (A) The cells were cultured with 5% serum. BrdU incorporation between 20 to 24 hrs was measured. (B) The cells were culture with non-serum medium. The LDH activities in the supernatants were indicated as percent lysis.

第三章

IFN- γ による肝細胞障害における 癌抑制因子 p53 の解析

3-1 緒言

p53 タンパク質は DNA 型腫瘍ウイルスSV40 の大型 T 抗原と特異的に結合するタンパク質として 1979 年に発見された⁽¹⁰³⁾。発見当初は初代ラット胎児線維芽細胞を活性化型 ras 遺伝子との共同作業でトランスフォームし、単独でも不死化することから、myc 遺伝子などが属する不死化型癌遺伝子として定義された。後の研究から初期にクローン化された遺伝子は変異型であることが判明し、野生型は癌抑制遺伝子であることを示す多くの報告がなされた。そして 1993 年に p53 が転写因子として Cdk (cyclin dependent kinase) を阻害するタンパク質 p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} 遺伝子の発現を誘導し、細胞増殖を G1 期で停止させることが明らかにされた^(104, 105)。p53 はここで癌抑制遺伝子としての座を確立し、一躍注目されることとなった。

p53 タンパク質は C 末端の多量体形成ドメインを介して二量体を形成し、さらにこの二量体同士が DNA を挟んで対象に配置し、四量体を形成することが予測されている^(106, 107)。そして転写因子として p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} 以外に gadd45, mdm2, Fas, Bax, Cyclin G など誘導することが報告されている⁽¹⁰⁸⁻¹¹²⁾。mdm2 は p53 に結合して不活化する自己調節因子として知られているが、他は細胞周期、DNA 修復、あるいはアポトーシスに関連する因子である。

p53 タンパク質は紫外、放射線、抗癌剤などによって DNA が損傷を受けると細胞内の発現量が上昇し細胞周期が G1 期に停止し、またはアポトーシスを起こすことが知られている。このことから、概念的には、DNA に傷を受けた細胞の細胞周期を停止させ、DNA 修復の時間稼ぎをし、また修復不可能な損傷を受けた細胞にはアポ

トーシスを誘導し、細胞の癌化を抑制していると考えられている。実際 p53 遺伝子はヒトの癌で最も高頻度に変異を起こしている。細胞周期と癌抑制因子についてと癌抑制因子 p53 の構造と機能についてそれぞれ Figure 3-1 と Figure 3-2 に模式的にまとめた。

このように細胞周期の停止やアポトーシスにおいて、p53 が重要な役割を果たしていることがつぎつぎと示されてきた。IFN- γ も初代培養肝細胞に対し DNA 合成を阻害し、そしてそれに引き続いて細胞死を誘導するものであることから p53 が何らかの関与をしていることが推測された。そこで IFN- γ 処理した肝細胞内における p53 の発現を検討した。

3-2 試薬と実験方法

3-2-1 試薬

抗マウス p53 モノクローナル抗体を産生するhybridoma (PAb 122) はAmerican Type Culture Collection より購入した。実験には protein G column で精製して使用した。その他の試薬は第二章と同様に調製した。

3-2-2 初代培養肝細胞の単離と培養

第二章と同様に行った。

3-2-3 核タンパク抽出液の調製

肝細胞は、0.1 M クエン酸、1 % Triton X - 100、に懸濁し、1 分間 vortex を行い、2 分間、750 x g にて遠心して単離核を得た。得られた核は、SDS-sample buffer (1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10mM Tris-HCl pH6.8, 20% glycerol) で可溶化し、遠心にてdebrisを除き核タンパク抽出液を得た。

3-2-4 免疫沈降とウエスタンブロッティング

肝細胞は RIPA (10mM Tris-HCl pH8.4, 1% NP-40, 0.1% Sodium Deoxycholate, 0.1%SDS, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 10mg/ml Aprotinin, 100mM NaF, 0.2mM Na₃VO₄, 0.5mM PMSF) で可溶化した。cell lysate は遠心

して debris を除いた後、あらかじめ mouse IgG を conjugate させた proteinG-sepharose を加えて 4 °C で 1 時間 インキュベートした。つづいて遠心により proteinG-sepharose を取り除いた後、あらかじめ anti-mouse p53 antibody を conjugate させた proteinG-sepharose を加えて 4 °C で 1 時間 インキュベートした。インキュベート終了後 proteinG-sepharose を RIPA で 5 回洗浄し、SDS-sample buffer (1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10mM Tris-HCl pH6.8, 20 % glycerol) で抽出した。SDS-sample buffer で抽出後、7.5- 20% gradient gel にて SDS-PAGE を行った。泳動終了後、PVDF membrane (Millipore) に転写し 5% スkimミルクで一晩ブロッキングを行った。つぎにビオチン化 抗マウス p53 モノクローナル抗体 (PAb 122) にて インキュベート後、アビジン化 peroxidase で インキュベートし、ECL (Amersham Corp., Buckinghamshire, England) で検出した。

ウエスタンブロッティングでは、抗マウス p53 モノクローナル抗体 (PAb 122) にて incubate 後、peroxidase を結合させた二次抗体で インキュベートし、ECL (Amersham Corp., Buckinghamshire, England) で検出した。

3-2-5 RNA の抽出とノザンブロッティング

肝細胞の total RNA は TRIzol (Amersham Corp., Buckinghamshire, England) を使用して得た。20 μ g の total RNA を 0.1M MOPS, 2.2M formaldehyde を含む 1 % 変成アガロースゲルで分離し、nylon membrane (HybondN+, Amersham Corp., Buckinghamshire, England) にキャピラリー法で転写した。5 $\times$ SSC, 0.1% SDS, 5% Dextran sulphate で 60°C, 3 時間, プレハ

イブリダイゼーションを行い、つづいて 20 ng/ml の濃度でプローブを使用し60℃、16 時間 ハイブリダイゼーションを行った。membrane は1×SSC, 0.1 % SDSで60℃, 15 分洗浄後、0.5×SSC, 0.1 % SDSで 60℃, 15 分洗浄した。検出は Fluorescein Gene ImagesTM dioxetane detection module (Amersham Corp., Buckinghamshire, England) に従って行った。

3-2-6 プローブの作成

Fluorescein-11-dUTP-labeled DNA プローブは肝細胞から調製した cDNA からFluorescein-11-dUTPを含むバッファー中で PCR を行って作成した。プライマーとして p53 (sense) TGTGTAATAGCTCCTGCATGG; (anti-sense) TCTTGGTCTTCAGGT-AGCTGG, p21(sense) TCCAATCCTGGTGATGTCC; (anti-sense) ACACCAGAGTGCA-AGACAGC, を使用した。

3-3 結果

3-3-1 IFN- γ で刺激した初代培養肝細胞におけるp53タンパク質発現の検討

初代培養肝細胞を 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 % 血清、および 100 U/ml IFN- γ 存在下で培養し、各時間に全細胞成分から抗 p53 抗体にて免疫沈降を行った。その結果、刺激後 12 時間から p53 タンパク質の発現量は増加しはじめ、24 時間に最大となった (Figure 3-3. A)。IFN- γ を添加していないコントロールでも同様な時間で p53 タンパク質の発現が観察されたが、その発現量に有意な差が確認された。そこで IFN- γ の濃度を変えて添加し、最大の発現量となる 24 時間で免疫沈降を行った (Figure 3-3. B)。その結果、IFN- γ の濃度に依存して p53 タンパク質の発現量の増加が確認され、約 10 U/ml の濃度で最大の発現量に達した。この p53 タンパク質の発現量の IFN- γ 依存性は、先の肝細胞の DNA 合成阻害の IFN- γ 依存性 (Figure 2-1. A) と関連していると考えられた。p53 タンパク質は核タンパク質であり、放射線などによる DNA 損傷時にも核に蓄積することが知られているので、続いて肝細胞の核タンパク抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングを行った (Figure 3-1. C)。その結果、全細胞からの免疫沈降の結果と同様に 24 時間をピークとした増加が観察された。

以上の結果より、IFN- γ は癌抑制因子 p53 タンパク質を濃度依存的に初代培養肝細胞内に増加させ、そして増加した p53 タンパク質は主に核内に存在することが明らかになった。また p53 タンパク質の発現量は IFN- γ で刺激 24 時間後に最大となった。

3-3-2 IFN- γ で刺激した初代培養肝細胞における p53 mRNA の検討

初代培養肝細胞を 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 % 血清、および 100 U/ml IFN- γ 存在下で培養し、各時間の total RNA を調製した。この total RNA より p53 のノザンブロッティングを行った (Figure 3-4)。その結果、いずれのサンプルにおいても p53 mRNA の発現が確認されたが、IFN- γ を添加したサンプルのみに p53 mRNA の発現が増加することが確認された。p53 mRNA は IFN- γ 添加後、48 時間まで徐々に増加し続けた。5-Fluorouracil (5-FU) は DNA 損傷を引き起こす強力な抗癌剤として知られており、初代培養肝細胞に対し 25 μ g/ml の濃度で完全に DNA 合成を阻害することを確認した (Figure 3-5)。また、LDH release によりこの濃度の 5-FU では肝細胞は細胞死を起こさないことも確認している (data not shown)。しかし、5-FU では p53 mRNA の増加をほとんど誘導しなかった。

3-3-3 IFN- γ で刺激した初代培養肝細胞における Cdk inhibitor p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の検討

サイクリン依存性キナーゼの活性を抑え、細胞周期を負に調整する p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} 遺伝子は、p53 によって活性化されることが知られている。初代培養肝細胞も IFN- γ とともに培養することによって DNA 合成が強く抑制され、そして p53 タンパク質の発現増加が観察されたことから、p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の発現をノザンブロッ

ティングによって検討した。その結果、IFN- γ 存在下で培養することによって p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の発現が刺激後 12 時間と 36 時間の二段階で増加することが判明した (Figure 3-6)。また、DNA 損傷性の薬剤 5-FU では、p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の発現が強く誘導された。

3-4 考察

癌抑制因子である p53 タンパク質は細胞周期の進行を負に抑制し、アポトーシスの誘導に深く関わっている。p53 タンパク質は Cdk inhibitor である p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の発現を誘導し、そして p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} タンパク質はサイクリン - Cdk 複合体のキナーゼ活性を抑制して Rb タンパク質のリン酸化を阻害し、その結果、細胞周期を G1 期に停止させる。しかし、p53 による細胞周期制御についても p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} 以外にはほとんど分かっていないのが現状であり、またこれに関しても p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} の Cdk inhibitor としての特異性はさして高くなく、なぜ p53 依存性の細胞周期停止が G1 期で起こるのか詳細は分かっていない。また、p53 の温度感受性変異株によりアポトーシスを p53 が起こせることが示されており^(113, 114)、放射線障害などの DNA 損傷時には、p53 タンパク質の発現が上昇し、p53 欠損細胞では DNA 損傷時におけるアポトーシスが起きにくいことが報告されている^(115, 116)。しかしながら、p53 タンパク質の発現機構は分かっていない。DNA 損傷時にもタンパク質の発現量は増加するものの mRNA の変化はみられず RNA 合成の阻害剤であるアクチノマイシン D 存在下でも p53 タンパク質の増加が観察されている⁽¹¹⁷⁾。DNA 損傷性の薬剤である 5-FU でも p21 mRNA の発現量は大きく上昇するにも関わらず p53 mRNA にはほとんど変化がないことを実際に示した。p53 は核内に蓄積して DNA の損傷部位に結合し、DNA の複製を阻害し DNA 修復の時間稼ぎをしているとも考えられている。従って、p53 タンパク質は半減期の短いタンパク質であるが、核内に蓄積することによって分解から逃れ発現量が増加すると推測されている。

IFN- γ による初代培養肝細胞に対する障害は、DNA の複製の停止に続いて細胞死を誘導するものであった。そしてp53 タンパク質の増加に続いて、p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の誘導がみられた。これは、DNA 損傷時に観察される現象と似ている。しかし DNA 損傷時と決定的に異なることに、p53 mRNA の増加がみられることを確認した。これは p53 研究においても極めて重要な知見であると考えられる。ヒトの p53 遺伝子上流配列は -842 まで報告されているが (ACCESSION X54156)、これを調べると GAS (gamma-interferon activated site) の保存配列 (TTNCNNNAA)⁽¹¹⁸⁾ (Figure 3-7) が4つ存在していた。これはIFN- γ のシグナル伝達を担う GAF (gamma-interferon activated factor, STAT1 α のホモダイマー) の認識配列であり、実際に GAF によって p53 遺伝子が活性化されるのかどうか興味深い。

IFN- γ とともに肝細胞を培養することによって p53 タンパク質の増加が観察されたが、24 時間をピークに急激に減少した。p53 mRNA や、p53 によって誘導されるp21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA は増加し続けることを考えると、説明が困難である。ただ、p53 タンパク質は半減期が極めて短く、ユビキチン - プロテオソーム経路で分解されることが報告されている⁽¹¹⁹⁾。また、DNA 損傷時にも細胞周期の G1 期のみで p53 タンパク質の発現が増加し、そして p53 protein 自体が p53 mRNA に結合して、翻訳のnegative feedback がかかることも報告されている⁽¹¹⁸⁾。p53 タンパク質はこのような厳密で微妙な制御を受けるため、IFN- γ によって G1 期での停止を終えた肝細胞においても、p53 に negative feedback がなかったのかもしれない。

肝細胞をIFN- γ で刺激することによって CDK inhibitor p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} のmRNA

が二段階で誘導されることが明らかとなった。p53 タンパク質の解析からおそらく 36 時間で誘導される mRNA は p53 タンパク質による制御を受けていると思われる、12 時間で誘導されるものは p53 非依存性であると考えられる。最近 p21^{Waf1/Ci p1/Sdi1} 遺伝子が、STAT1 で活性化されること⁽¹²⁰⁾、放射線障害時の細胞周期停止と、p21^{Waf1/Ci p1/Sdi1} の誘導には p53 タンパク質と IFN- γ 誘導性転写因子 IRF-1 の両方の転写因子が必要であること⁽¹²¹⁾、などが次々と報告された。12 時間で誘導される p21^{Waf1/Ci p1/Sdi1} mRNA は、STAT1 か IRF-1 どちらか、あるいは両方が関与しているのではないかと推測される。

IFN- γ で刺激した肝細胞内に p53 が誘導されることを確認できたことは、STAT, IRF-1 などのインターフェロンシグナル伝達系の機能を考えるうえで極めて重要な知見と思われる。

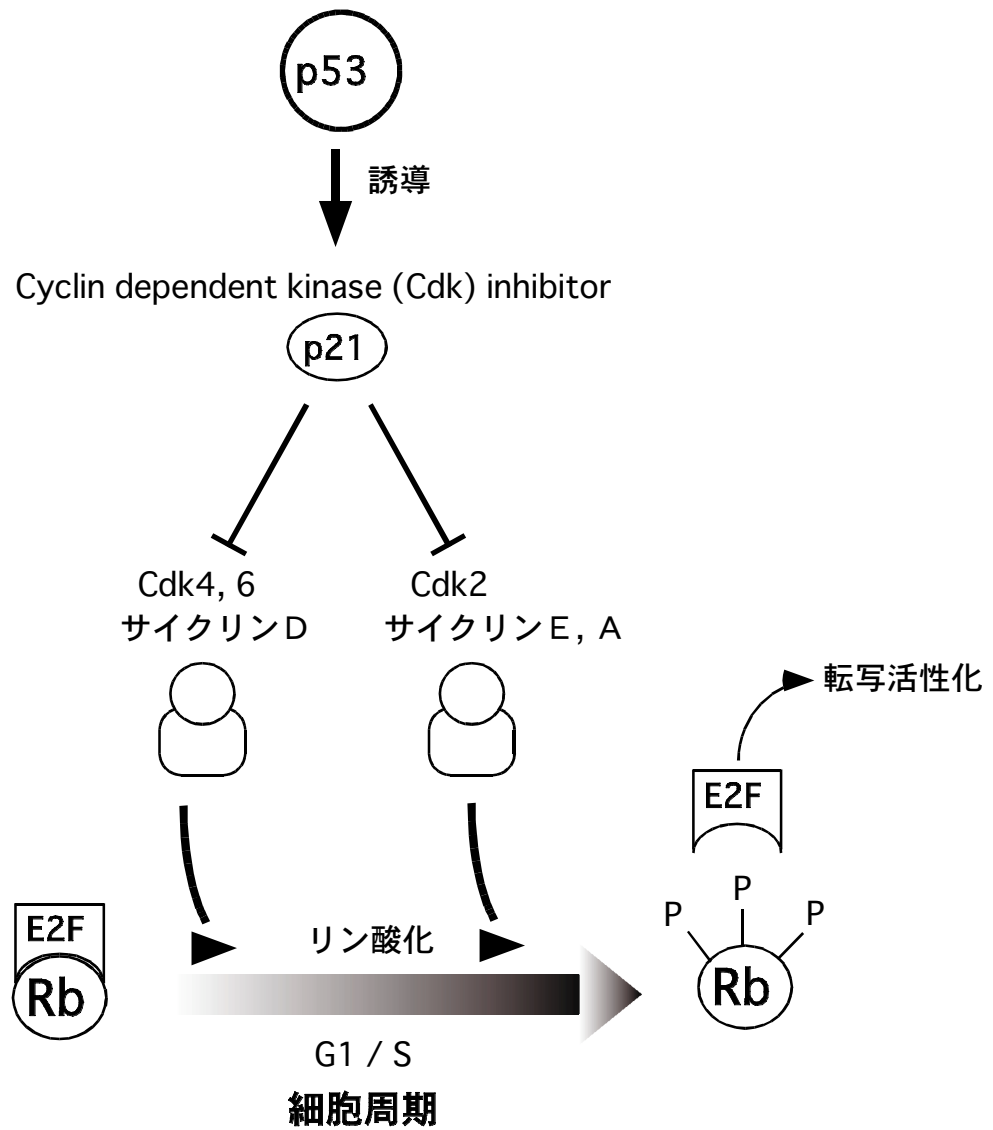


Figure 3-1. 癌抑制遺伝子と細胞周期

p53

p53 遺伝子はヒトの癌において最も高頻度に異常が見られ、そのタンパク質は DNA 損傷時に核内に蓄積し、DNA 合成の抑制やアポトーシスを誘導することから、癌抑制因子と考えられている。また転写因子としての機能も持つ。



- ・ p53 タンパク質は細胞周期のG1期に増加し、また、過剰発現によりG1期に特異的に細胞周期を停止する。
- ・ DNA 損傷時においてタンパク質の増加は観察されるが、mRNAの増加はほとんど観察されない。

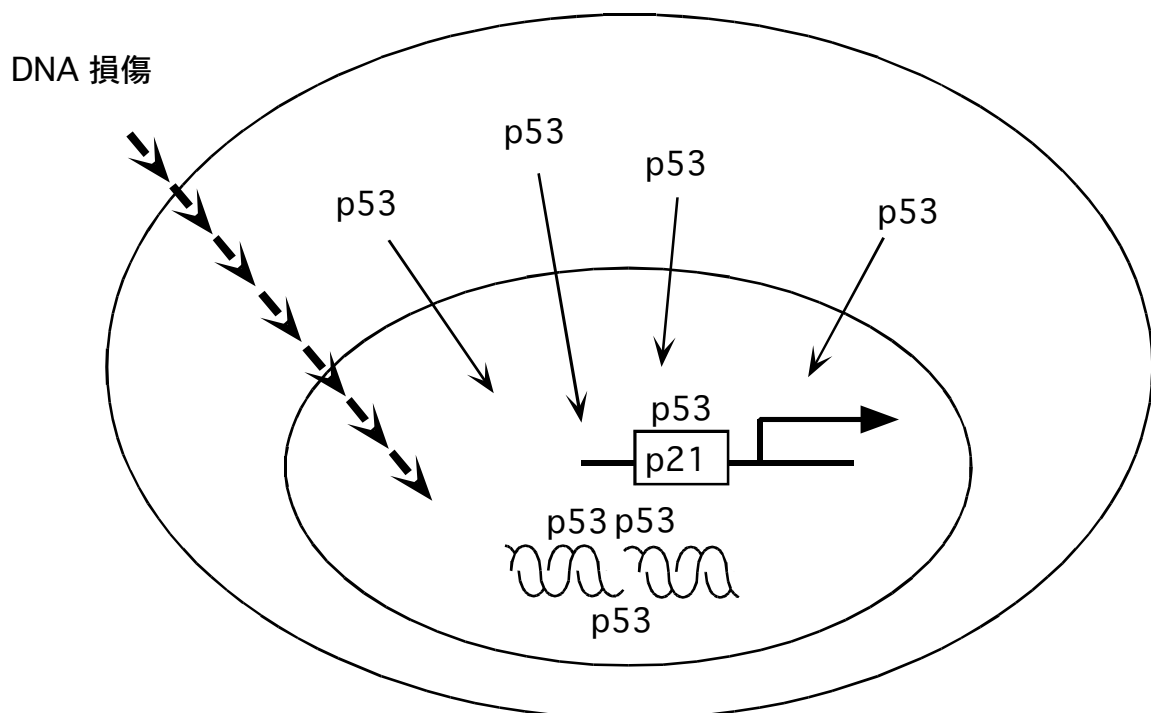
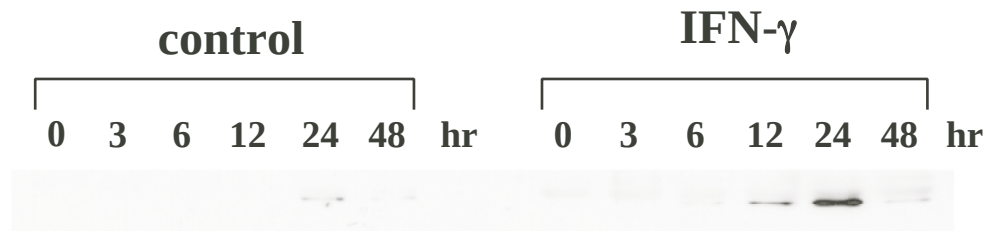
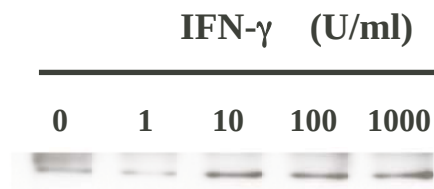


Figure 3-2. 癌抑制因子 p53 の構造と機能

A



B



C

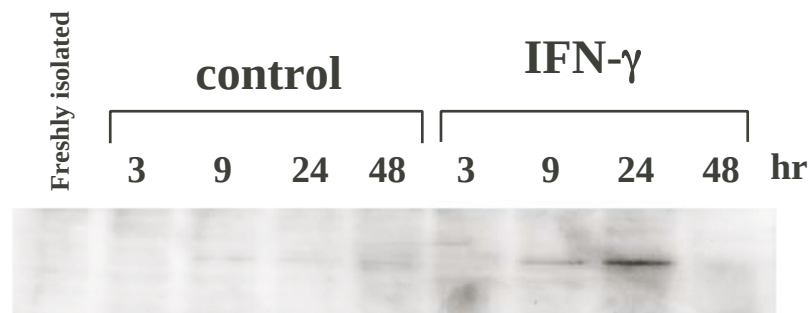


Figure 3-3. p53 protein expression in IFN- γ -treated hepatocytes. Hepatocytes were cultured with IFN- γ , then the protein expression of p53 in these cells were examined. (A) Hepatocytes treated with IFN- γ (100 U/ml) were harvested at the desired time and subjected to immunoprecipitation for p53. (B) Hepatocytes were cultured with IFN- γ for 24 hrs, then immunoprecipitation of p53 was carried out. (C) Hepatocytes were treated with IFN- γ (100U/ml), then the nuclei were extracted. The nuclei were subjected to Western blotting for p53.

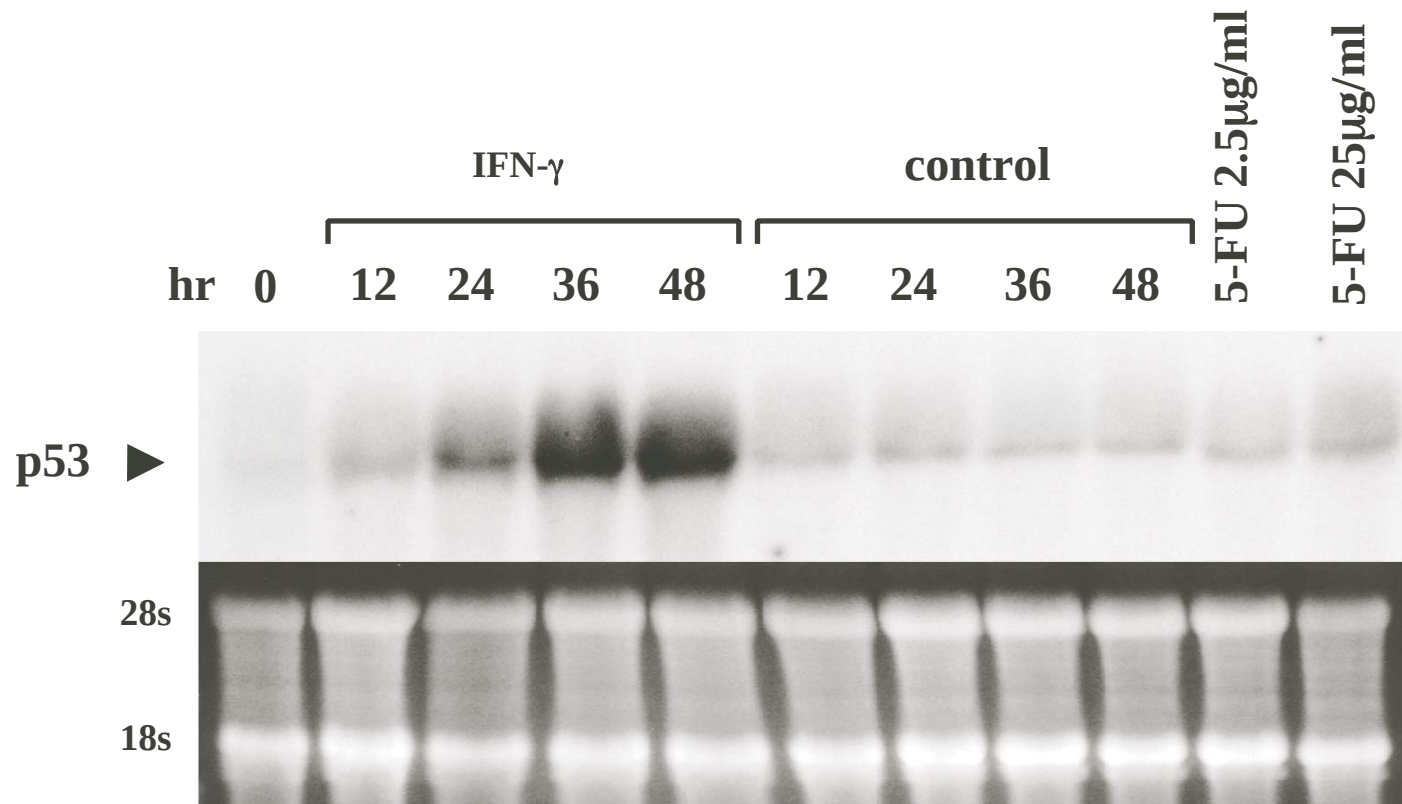


Figure 3-4. Analysis of p53 mRNA expression in IFN- γ treated hepatocytes. Hepatocytes were cultured with IFN- γ (100 U/ml) in the presence of EGF (10 ng/ml), Insulin (100 nM) and serum (5 %). The RNAs were extracted at the desired times and subjected to Northern blot analysis.

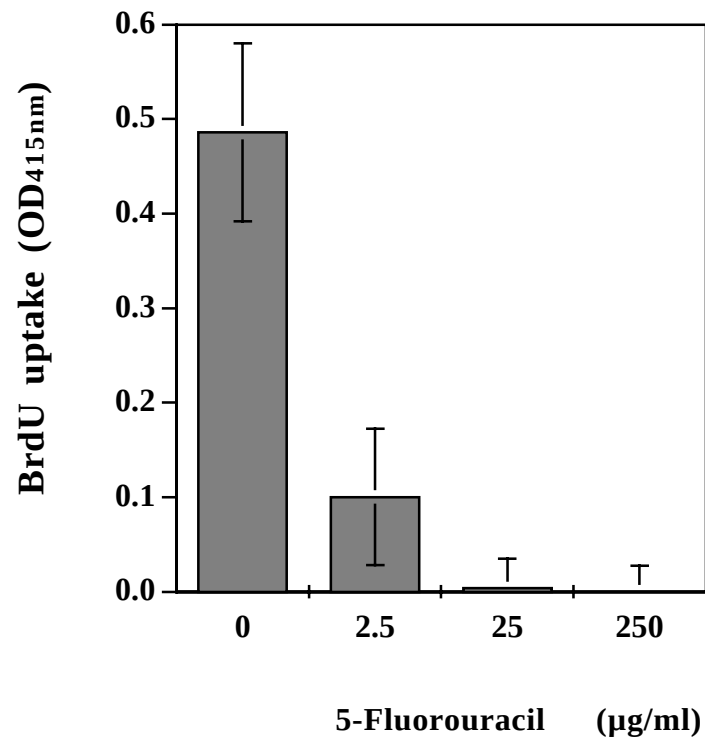


Figure 3-5. Effect of 5-Fluorouracil on DNA synthesis of primary cultured hepatocytes. Hepatocytes were cultured with 10 ng/ml EGF, 100 nM Insulin, 5 % serum in the presence of indicated concentraion of 5-Fluorouracil.

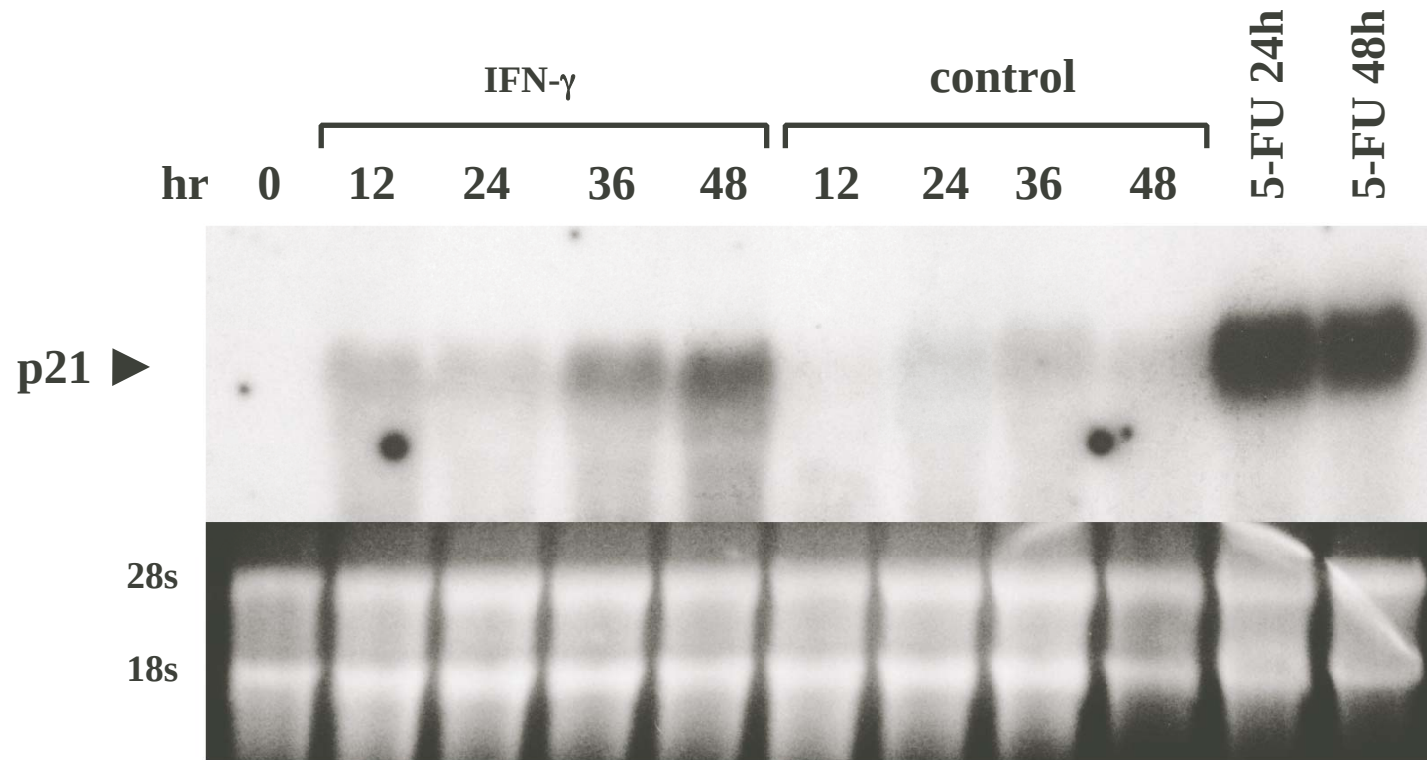


Figure 3-6. IFN- γ induced p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA expression in hepatocytes. Total RNAs were extracted from hepatocytes treated with IFN- γ (100 U/ml) for various times, the subjected to Northern blot analysis. Hepatocytes were also treated with a DNA damage reagent, 5-FU (25 μ g/ml).

ATAAATCTTA	TCAGAGTGAT	AAGGGTTGTG	AAGGAGATTA	-453
AATAAGATGG	TGTGATATAA	AGTATCTGGG	AGAAAACGTT	-413
AGGGTGTGGA	<u>TATTACGGAA</u>	<u>AGCCTTCCTA</u>	<u>AAAAATGACA</u>	-373
TTTAACTGAT	GAGAAGAAAG	GATCCAGCTG	AGAGCAAACG	-333
CAAAAGCTTT	CTTCCTTCCA	CCCTTCATAT	TTGACACAAT	-293
GCAGGATTCC	<u>TCCAAAATGA</u>	<u>TTTCCACCAA</u>	TTCTGCCCTC	-253
ACAGCTCTGG	CTTGCAGAAT	TTTCCACCCC	AAAATGTTAG	-213

Figure 3-7. Nucleotide sequence of the human p53 gene promoter. GAS (TTNCNNNAA) is underlined.

第四章

IFN- γ の p53 欠損 肝細胞に対する影響

4-1 緒言

ある分子の本質的機能を解析し、重要性を把握するためには、遺伝子工学や、分子生物学的手法は欠かせない。株化細胞においてはいまや遺伝子工学的手法を用いて自由自在に好みの細胞を作り出せるようになった。しかしながら、初代培養細胞では自由自在とはいかず、限定されたものになってしまう。特に初代培養肝細胞は、増えない（継代できない）細胞であり、遺伝子工学的手法はきわめて困難である。唯一の確実な方法が、targeting により目的の遺伝子を破壊した欠損（knock out）動物から細胞を調整する方法であり、それに代わる期待される方法が、anti-sense 遺伝子を用いる方法である。欠損動物から単離する方法は、動物さえ目的の遺伝子が確実に破壊されているならば、単離してきた細胞も確実に破壊されている。しかし、発生の段階で死亡してしまったり、あるいはそもそもその遺伝子を欠損した状態で胚幹細胞から発生してきており、相補的な経路が過剰に発達してしまったなどの理由から機能の重複により、期待した結果が出ないことがあり得る。つまり欠損動物は基本的に異常な動物なのである。その点 anti-sense 遺伝子を用いる方法は、必要な時期だけ目的の分子を欠損させることが可能なため、細胞生物学を行う上で、魅力のある方法である。しかし、現状ではまだまだ方法が確立されていない。とくに anti-sense oligo DNA を設計するための統一的理論がないのである。実際、anti-sense を使用しても効果がないことが多い。そして効果があったとしても、特異性を評価するために複数のコントロールを使う必要がある。また p53 については dominant negative あるいは温度感受性変異タンパク質などで重要な成果が上げられてきたが、やはり遺伝子を人為的に発現させるという点で実際

には使用が難しいと考えられる。

遺伝子組み替えマウスは、目的の分子の個体における本質的な役割を解析するのに有用だけでなく、多くの病因が遺伝的背景に起因していることが明らかになりつつある現在、その予防と治療について重要な知見を与えるとともに、原因遺伝子の機能に関する研究材料となり得る。p53 は ES 細胞や、増殖能の高い細胞で良く発現していることから、発生や分化に関わっているのではないかという予想に反して、ホモの個体も正常に発生し、繁殖能力もある⁽¹²²⁾。しかしながら、p53 欠損マウスでは、肉腫や、悪性リンパ腫などが多くみられる高発癌性という特徴をもっている。

肝細胞は IFN- γ によって DNA の複製が阻害され、その後細胞死が誘導された。この現象には p53 タンパク質が関与していることが推測され、そして実際に p53 タンパク質が誘導されていることが確認された。また IFN- γ によって誘導される p21^{Waf1/Ci p1/Sdi1} mRNA の発現が p53 タンパク質に依存していることが推測された。しかしながら、IFN- γ による細胞障害に p53 タンパク質が必須のものであるか否かは欠損細胞を使うほかになく、また細胞周期停止や、アポトーシスへの重要性が数多く報告されていることから、IFN- γ による細胞障害に p53 タンパク質が本質的に関与しているかどうかを欠損動物を使用して検討する意義があると考えられた。これらの内容を Figure 4-1 にまとめた。

この章では、p53 anti-sense oligo nucleotide も試みながら、p53 欠損マウスから単離した肝細胞を中心に IFN- γ の機能を検討した。

4-2 試薬と実験方法

4-2-1 試薬

第二章、及び第三章と同様に調整した。

4-2-2 肝細胞の単離

第一章と同様に調整した。

4-2-3 アンチセンス oligo nucleotide の設計

アンチセンス oligo nucleotide を開始コドンをはさんで以下の配列をホスホジエステラーゼ結合 (s-oligo) で作成した。

5'-TGGCAGTCATCCAGCTTCGG-3'

実験には10 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加して使用した。

4-2-4 p53 欠損マウス

p53 欠損マウスは熊本大学医学部形態発生部門の相沢慎一先生より供与された⁽¹²²⁾。肝細胞は ICR マウスと同様に単離して使用した。

4-2-5 p53 プライマーの作成

p53 欠損マウスから単離した肝細胞の p53 遺伝子が targeting されていること

を確認するために、targeting 部位にある、neo gene を挟むようにプライマーを作成し、RT-PCR を行った。（sense）ACCATCCTGGCTGTAGGTAG, （anti-sense）GCACATAACAGACTTGGCTG。増幅配列；465 bp

4-2-6 RNA の抽出とノザンブロッティング

第二章と同様に調整した。

4-2-7 プローブの作成

p53 DNA プローブは第三章と同様に調整した。p21 RNA プローブは、以下のよう調整した。プライマーとして（sense）TCCAATCCTGGTGATGTCC, （anti-sense）ACACCAGAGTGCAAGACAGC, を使用して肝細胞より調整した cDNA から RT-PCR 行い、得られた産物を pGEM-T Vector Systems（Promega Corp. USA）によりクローニングした。このベクターをテンプレートとして T7 RNA polymerase を使用して Fluorescein-11-dUTP を含むバッファ中で *in-vitro* 転写を行って作成した。

4-3 結果

4-3-1 IFN- γ による肝細胞の DNA 合成阻害に及ぼす anti-sense p53 oligo nucleotide の影響

IFN- γ で刺激すると同時に anti-sense p53 oligo nucleotide を添加して肝細胞を培養し、IFN- γ による DNA 合成の阻害に与える影響を調べた (Figure 4-2)。その結果、anti-sense p53 oligo nucleotide は、IFN- γ を添加していないコントロールの DNA 合成活性には何の影響も与えなかったのに対し、IFN- γ による DNA 合成阻害に若干の影響を与えずに DNA 合成が増加した。この結果より、p53 タンパク質はIFN- γ による DNA 合成阻害に何らかの関与をしていることが推測された。

4-3-2 p53 欠損マウスから単離した肝細胞の p53 targeting の確認

提供された p53 欠損肝細胞は、exon 2 に存在する制限酵素サイト Nco I に neo 遺伝子を挿入し、開始コドンを除くしてある (Figure 4-3, A)⁽¹²²⁾。neo 遺伝子は、約 1.1 kb の長さがあるため、p53 遺伝子あるいは p53 mRNA は wild type より1.1 kb 長くなるはずである。そこでプライマーを Nco I をはさんむように exon 1 と exon 4 に設計してRT-PCR を行った (Figure 4-3, B)。その結果、wild type では設計通りに約 465 bp のバンドが確認されたのに対し、p53 欠損マウスから単離した肝細胞ではその長さのバンドは全く確認できなかった。しかし、それより約 1.1 kbp 長い約 1.5 kbp の長さのバンドが、IFN- γ 刺激後 48 時

間のサンプルで確認された。この結果により、p53 欠損細胞から単離した肝細胞には、targeting された遺伝子しかないことが確認された。ただし、RT-PCR のレベルではあるが、IFN- γ によって targeting された遺伝子も活性化されることが示された。

4-3-3 p53 欠損肝細胞の DNA 合成とIFN- γ の影響

p53 欠損肝細胞の DNA 合成における IFN- γ の影響を経時的に調べた (Figure 4-4)。p53 欠損肝細胞は wild type よりも DNA 合成活性が高く DNA 合成のピークも若干早かった。IFN- γ はこの BrdU の取り込みを効果的に抑制した。しかし、5-FU では wild type の肝細胞の DNA 合成を完全に阻害する濃度でも p53 欠損肝細胞の DNA 合成を全く抑制せず、むしろ増加させた。この結果より、DNA 損傷性の薬剤である 5-FU も放射線照射による障害と同様に、p53 タンパク質依存的に細胞の増殖を阻害することが示された。

IFN- γ による p53 欠損肝細胞の BrdU の取り込みの抑制は、細胞死を誘導した結果かもしれない。そこで次に IFN- γ の細胞死への影響を調べた。

4-3-4 p53 欠損肝細胞におけるIFN- γ の細胞死誘導活性

p53 欠損肝細胞を 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 % 血清及び 100 U/ml の IFN- γ とともに培養した結果、LDH release が経時的に大きく増加した (Figure 4-5)。この結果は p53 を欠損している肝細胞でも IFN- γ は細胞死を誘

導できることを示しており、その細胞死誘導は、wild type よりもむしろすみやかなものであった。また無血清、無ホルモンで培養した場合には、IFN- γ を添加していないコントロールでも細胞死は引き起こされた。しかし、IFN- γ を添加することによってさらに早く細胞死が誘導された。

IFN- γ による p53 欠損肝細胞の細胞死誘導は、48 時間においてすでに 50 % を越えており、先の DNA 合成活性に対する影響は細胞死が誘導されたためと判断される。そして IFN- γ は p53 非依存的に肝細胞に細胞死を誘導することが明らかとなった。

4-3-5 IFN- γ による p53 欠損肝細胞の細胞死誘導における形態変化の観察

100 U/ml IFN- γ 存在下、無血清で培養したときの p53 欠損肝細胞の形態を観察した (Figure 4-6)。その結果、LDH releaseは大きく誘導されるにも関わらずその形態の変化は小さく接着状態を維持していた。このことは p53 タンパク質が、apoptotic body への変化を含む、細胞死にともなう形態変化に関与していることを示唆している。

4-3-6 IFN- γ による p53 欠損肝細胞の細胞死誘導におけるタンパク合成阻害剤の影響

IFN- γ による p53 欠損肝細胞の細胞死誘導におけるタンパク合成阻害剤、シクロヘキシミドの影響を LDH release により検討した結果、濃度依存的に細胞死を抑

制することが示された (Figure 4-7) 。これは、p53 欠損肝細胞においても IFN- γ による細胞死の誘導に新たなタンパク合成を必要とすることを示唆している。

4-3-7 IFN- γ で刺激した p53 欠損肝細胞における Cdk inhibitor

p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の検討

IFN- γ による p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA 誘導は p53 タンパク質に依存したものか否かを検討するために、p53 欠損肝細胞を使用してノザンブロッティングを行った (Figure 4-8) 。その結果、wild type において IFN- γ 刺激後 36 時間での p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の誘導は p53 欠損肝細胞では全く観察されなかった。一方 wild type において刺激後 12 時間で観察される p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA は p53 欠損肝細胞でもその発現が観察された。従って、IFN- γ 刺激後 12 時間で誘導される p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA は p53 非依存性であり、36 時間で誘導される p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA は p53 依存性であることが明らかとなった。このことは、p53 タンパク質の発現が 24 時間に最大になる事実と矛盾しない (Figure 3-3) 。また、wild type では、大きく p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA を誘導した 5-FU は、p53 欠損肝細胞では全く誘導しなかった。5-FU は p53 mRNA を誘導しないが (Figure 3-4) 、p53 タンパク質に依存して p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA を誘導することが明らかとなった。

4-4 考察

IFN- γ による肝細胞の DNA 合成の阻害や、細胞死誘導に癌抑制因子 p53 タンパク質が、どのような役割を担い、どの程度関与しているかを探るために、アンチセンス法による検討と、p53 欠損マウスより単離した肝細胞を使った検討を行った。アンチセンス法では、効果があるといわれている開始コドンをはさんだオリゴヌクレオチドを設計し、IFN- γ によるDNA 合成の阻害について検討した。その結果、このDNA 合成の阻害を若干抑制し、p53 の関与が推測された。しかしながら、このオリゴヌクレオチドの p53 タンパク質発現に対する阻害効果の程度や、特異性に対する検討が十分でなくこれ以上の考察は困難であった。

p53 欠損マウスから単離した肝細胞を targeting 部位をはさむように設計したプライマーにより RT-PCR で解析した結果、wild type と同じ位置にはバンドが検出されず、targeting がなされていることを確認することができた。しかし、RT-PCR のレベルではあるが、この targeting されている遺伝子もIFN- γ によって誘導されることを観察した。これはプロモーター部位がそのまま残っているため、IFN- γ によって p53 遺伝子が活性化されたのではないかと推測する。

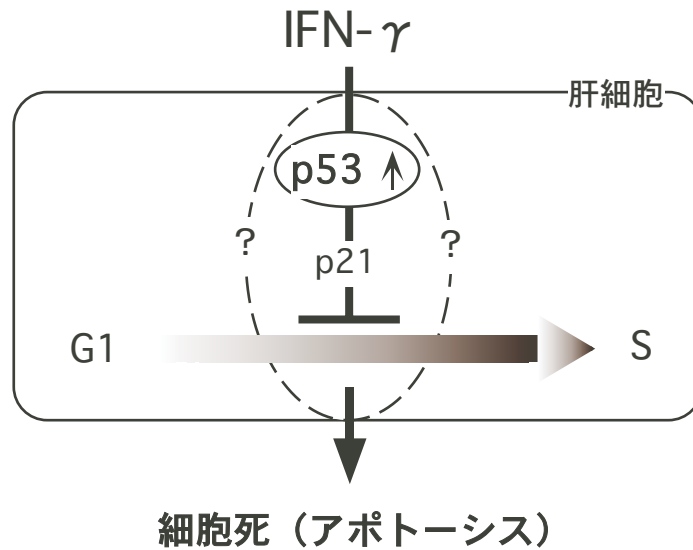
p53 欠損肝細胞は抗癌剤でもある 5-FU に対して抵抗性であり、DNA 合成が全く阻害されないことを確認した。しかし、IFN- γ は p53 欠損肝細胞にはむしろよりすみやかに細胞死を誘導した。またこの結果、IFN- γ の p53 欠損肝細胞の DNA 合成活性に対する影響については判断が困難なものとなった。ただし、この p53 欠損肝細胞を無血清で培養することによって、p53 の機能の推測につながる興味深い現象を観察した。つまり、wild type では無血清で培養しても少なくとも 72 時間

の間、LDH release の顕著な増加は観察されず、血清存在下での培養とほとんど差がない。ところが、p53 欠損肝細胞は、無血清で培養すると著しく細胞死を引き起こした。これは wild type は栄養因子の枯渇によって、おそらく p53 依存的に細胞周期は停止し、静止状態に近くなったのに対し、p53 を欠損している肝細胞は静止することができず、無理に細胞周期が回ろうとした結果、p53 非依存的メカニズムによって細胞死を引き起こしてしまったのではないだろうか。というよりも p53 の本質的な役割は細胞死を誘導するものではなく、その前段階の細胞周期の停止を含む、細胞に "静止" を誘導するものであり、いわゆる DNA 修復などのための時間稼ぎをすることではないかと推測される。おそらく wild type における IFN- γ による細胞死の誘導が、無血清よりも血清存在下の方がより時間がかかるのは、細胞を静止させるのにより時間がかかり、p53 タンパク質もより大量に発現する必要があるためではないだろうか。実際に増殖能が高い細胞の方が p53 タンパク質の発現量が高いことが報告されている⁽¹¹⁸⁾。

p53 欠損細胞でも IFN- γ によって細胞死が強く誘導された。しかしながらその細胞死の形態は明らかに wild type とは異なっていた。この形態変化に対する影響は、CPP32 の阻害剤であるテトラペプチド Ac-DEVD-cho を使用したときの細胞の形態に対する効果 (Figure 2-12) と似ている。p53 がプロテアーゼである CPP32 を通じてアポトーシスにおける形態変化の誘導にも関与していることが考えられた。

p53 欠損肝細胞では IFN- γ 刺激後 12 時間の p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の発現は観察されたが、36 時間の発現の増加は全く観察されなくなった。この結果より、IFN- γ による p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の誘導は p53-dependent, -independent という

少なくとも二つのメカニズムによるものであることが示された。第三章でも言及したが、最近 p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} やアポトーシスの制御に STAT と IRF-1 が関与しているとの報告がなされており、どちらもインターフェロンシグナル伝達系であることから、IFN- γ による肝細胞障害への関与も十分に疑われる。また 5-FU は p53 欠損肝細胞では、p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA を全く誘導しなかった。これは 5-FU による p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA の誘導は p53 タンパク質に依存していることを示しているが、5-FU は p53 mRNA を誘導しない。DNA 損傷性のアポトーシスでは、DNA の損傷部位へ p53 タンパク質が結合して核へ蓄積することでタンパク量が増加し、さらにリン酸化による活性化も受けると考えられている。おそらく 5-FU も同じ機構を介するものと考えられる。以上より、IFN- γ による肝細胞の DNA 合成の抑制や、細胞死の誘導は、DNA 損傷性の障害機構と全く異なる経路によるものであることが示された。



IFN- γ による肝細胞障害にp53が本質的に関与するか否か明らかにする意義があると考えられた。

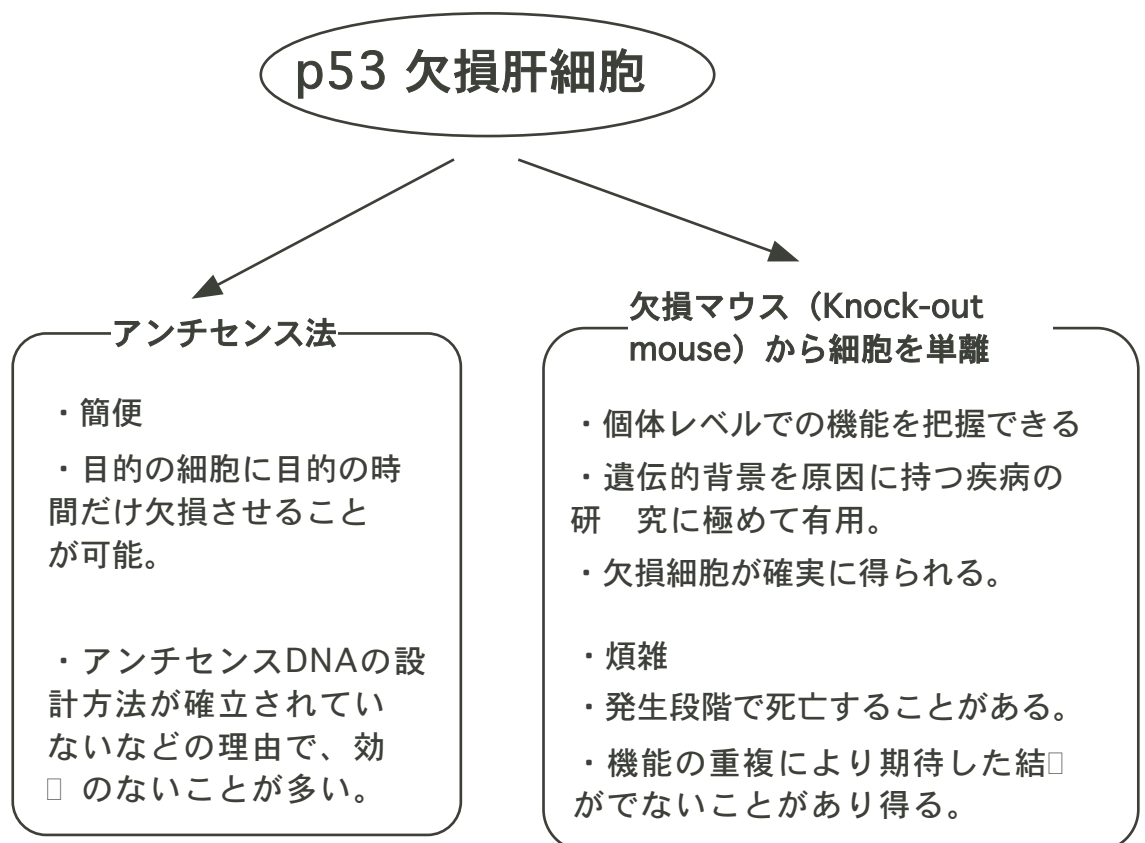


Figure 4-1. p53 欠損細胞について

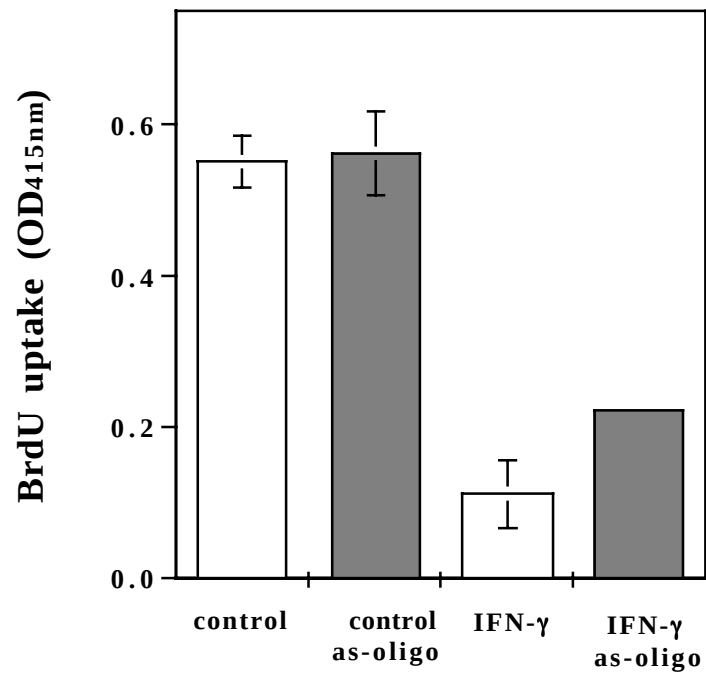
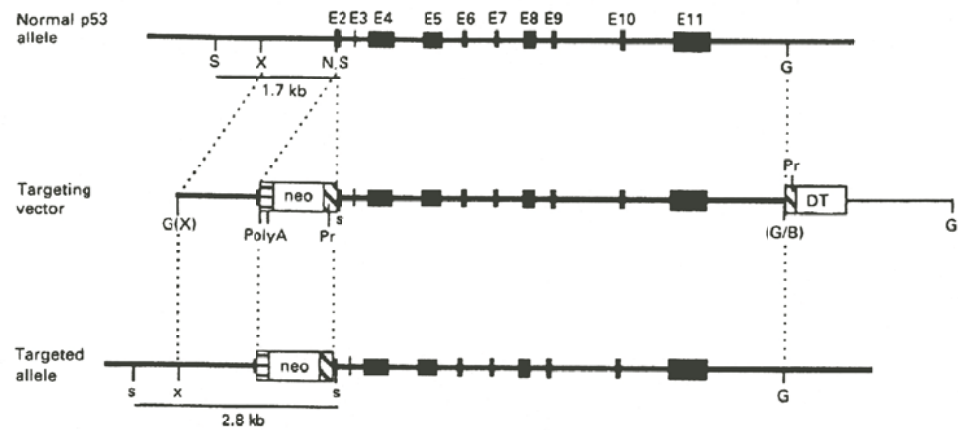


Figure 4-2. Effect of anti-sense p53 oligo nucleotide on DNA synthesis of primary cultured hepatocytes.

Hepatocytes were cultured for 48 hrs in the presence of 10 ng/ml EGF, 100nM Insulin and 5 % serum and without (open bars) or with (shaded) anti-sense p53 oligo nucleotide and 100 U/ml IFN- γ . BrdU incorporation between 24 to 48 hrs after stimulation was measured.

(A)



(B)

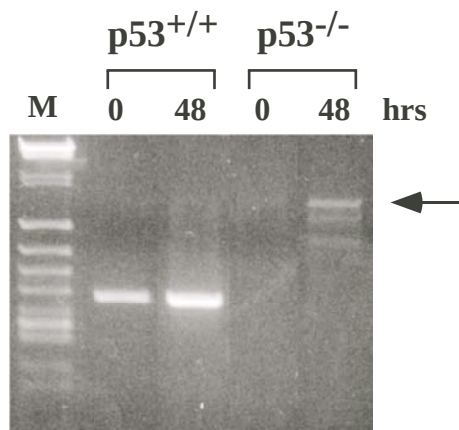


Figure 4-3. RT-PCR analysis of p53 in wild type and p53-deficient hepatocytes.

(A) Structure of endogenous p53 allele, targeting vector and targeted allele. 1.1kbp neo^r gene is inserted in the exon 2. (B) Agarose gel electrophoresis of amplified cDNA. Template cDNA was prepared from hepatocytes incubated with 100 U/ml IFN- γ for indicated time. The amplified length of wild type gene was 465bp and of targeted gene was 1.1kbp longer (indicated by arrow).

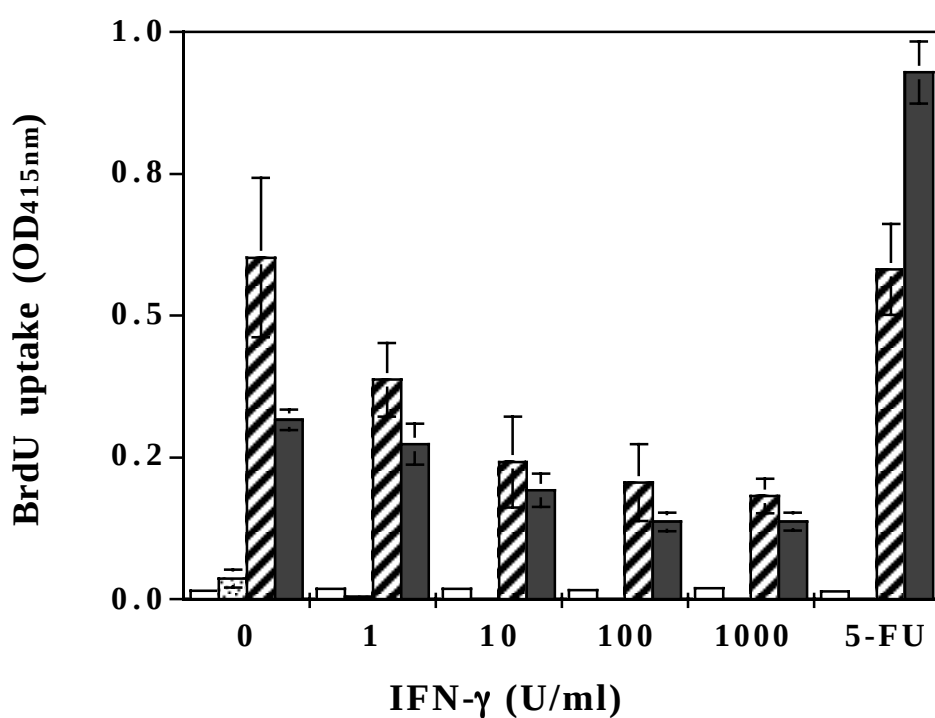


Figure 4-4. Time course analysis of DNA synthesis of p53-deficient hepatocytes. The cells were cultured with 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 % serum in the presence of indicated concentration of IFN- γ or 25 μ g/ml 5-FU. BrdU incorporation for 12 hrs was measured at 12 hrs (open bars), 24 hrs (dotted bars), 36 hrs (hatched bars), and 48 hrs (shaded bars).

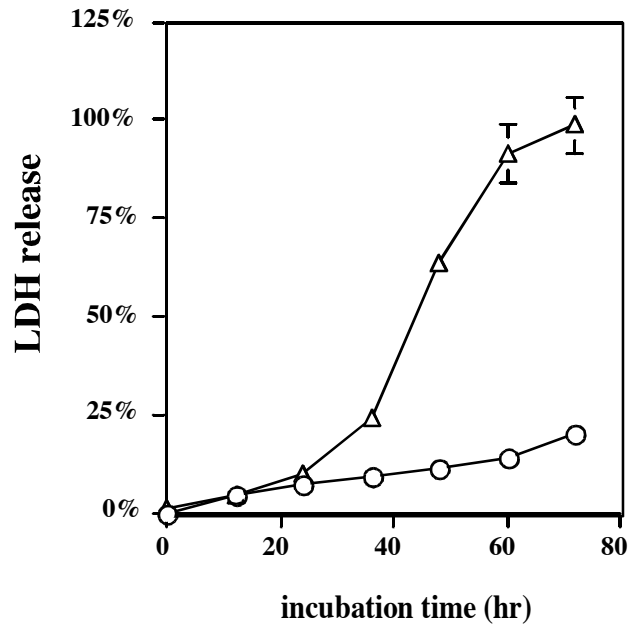
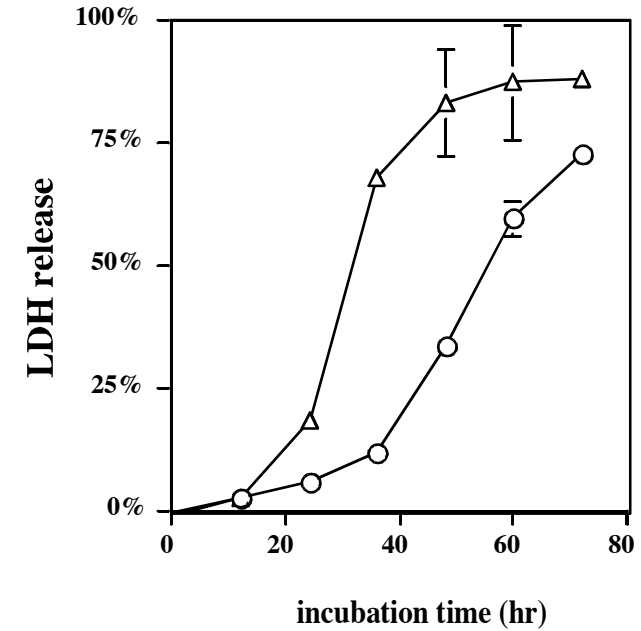
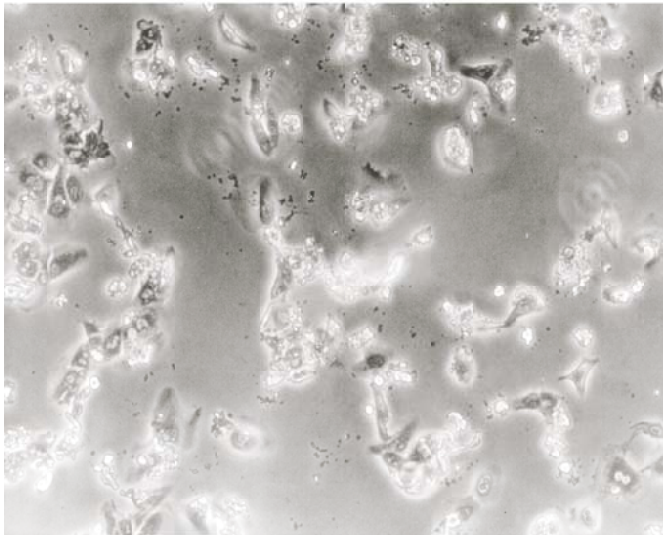
A**B**

Figure 4-5. Time course of IFN- γ -induced LDH release of p53-deficient hepatocytes. The cells were incubated without (circles) or with (triangles) 100 U/ml IFN- γ supplemented with (A) or without (B) 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5% serum.

p53^{+/+}



p53^{-/-}

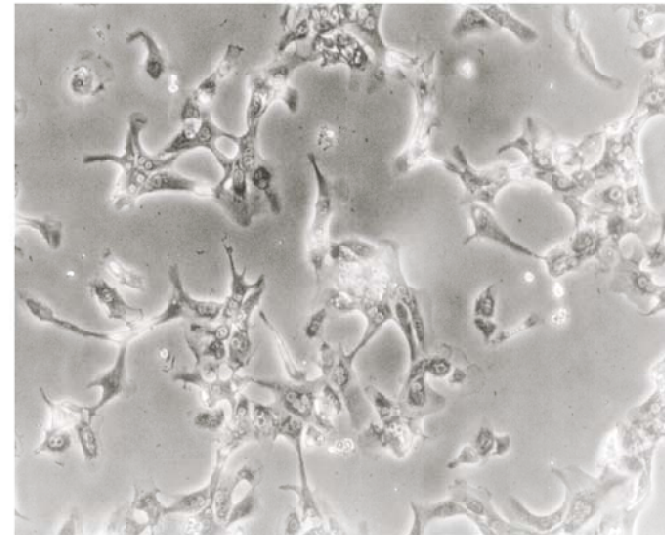


Figure 4-6. Effect of IFN- γ on morphological changes of p53-deficient hepatocytes. Primary cultured hepatocytes from p53-deficient mice were treated with IFN- γ , then the experiments were performed. Hepatocytes were cultured with IFN- γ (100 U/ml) for 48 hrs. The morphological changes were observed by a microscope. Magnification : x 40.

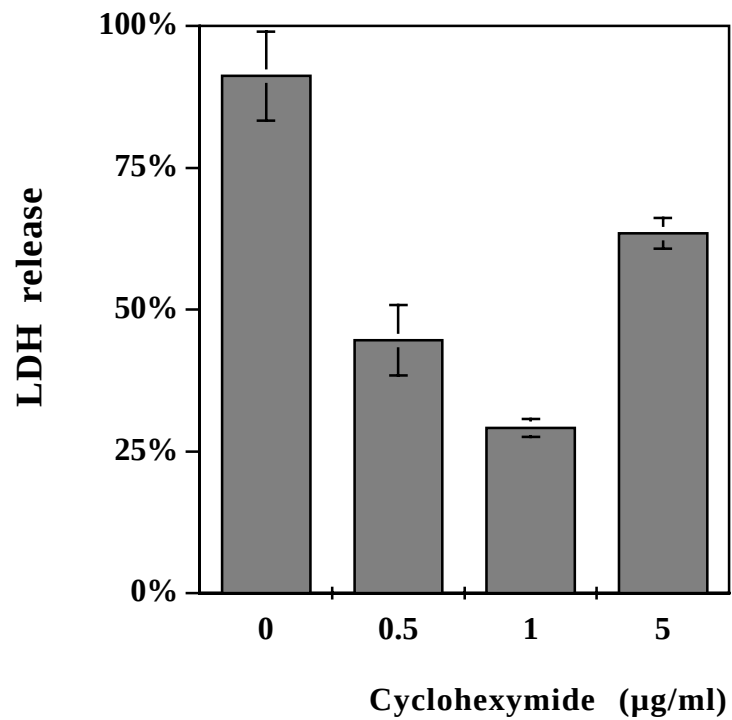


Figure 4-7. Cycloheximide inhibited IFN- γ -induced cell death in p53-deficient hepatocytes. Hepatocytes were cultured with IFN- γ (100 U/ml) in the presence of indicated concentration of cycloheximide. The LDH activities in the supernatants were measured after the incubation for 48 hrs.

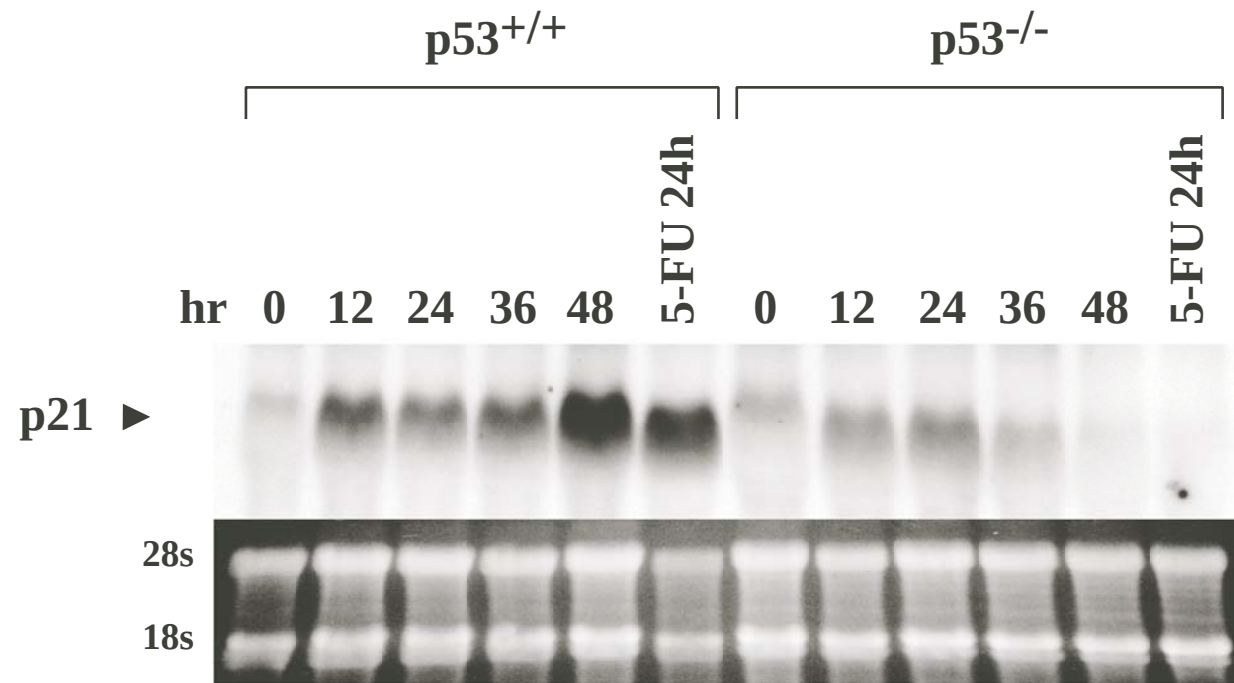


Figure 4-8. Expression of p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNA in p53-deficient hepatocytes treated with IFN- γ . Hepatocytes from p53-deficient mice were cultured with 10 ng/ml EGF, 100 nM insulin, 5 % serum, and 100 U/ml IFN- γ , then total RNAs were extracted from these cells and subjected to Northern blot analysis for p21 mRNA expression.

第五章

結論

5-1 結論

本研究は、IFN- γ による初代培養肝細胞への障害性の機序を明らかにすることから始まった。その結果、IFN- γ は肝細胞の細胞周期を停止させ、それに続いて細胞死を誘導することが明らかになった。そして細胞死の誘導には新たなタンパク合成を必要とすることが示された。この細胞障害性の機序は、明らかに DNA 損傷性の細胞障害と似ている。従って、p53 タンパク質の関与が疑われ実際に IFN- γ によって誘導されることが確認できた。p53 タンパク質がサイトカインによって誘導されると言う報告はおそらく初めてではないかと思われる。また DNA 損傷性の障害と決定的に異なる点として、p53 mRNA も IFN- γ によって肝細胞内に誘導されることを確認した。DNA 損傷時には p53 mRNA の誘導は観察されず、post-transcriptional な誘導であると言われているが、詳細は明らかにならず、p53 の誘導機構は p53 研究の上で課題になっている。従って、IFN- γ による肝細胞障害は、p53 研究の上でも重要な題材になり得ると考えられる。

IFN- γ によって肝細胞内に p53 が誘導されるにも関わらず、p53 欠損肝細胞を使用した検討により、IFN- γ は p53 非依存的に肝細胞に細胞死を誘導することが明らかとなった。しかしながら、p53 欠損肝細胞では細胞死に伴う特徴的な形態変化が観察されなかった。これはアポトーシスのメディエータとしてクローニングされたプロテアーゼ CPP32/Yama の特異的阻害剤に濃度依存的に観察される効果と似ているものであった。従って、p53 が CPP32 の制御を介してアポトーシスにおける特徴的な形態変化の誘導を行っている可能性が考えられた。

フローサイトメトリーを使用した肝細胞の細胞周期の解析は、IFN- γ が肝細胞に

対して一様な活性を持っているものではないことを示唆した。肝臓は部分肝移植に代表されるように、どの部分を切り出してもほぼ同様な構造をとり、全ての機能を担える臓器である。しかしフローサイトメトリーの解析は肝臓が決して均一な細胞集団ではないことを示した。IFN- γ のこの活性の違いが何を意味しているのが興味深い。

最後に本研究によって IFN- γ の新しい機能を明らかにすることが出来たとともに、アポトーシス研究における有効な題材を整えることが出来た。これらの結果は、初代培養肝細胞に注目することによって成し得たと考えられる。初代培養肝細胞の細胞周期と細胞死に注目することによって、今後も独自性のある研究が成されることが期待される。

5-2 今後の課題

- ・ インターフェロンのシグナル伝達は詳しく解析されているが、初代培養肝細胞においても STAT-JAK カスケードが働いているのか確認する必要がある。
- ・ ヒトp53 遺伝子のプロモーター部位に STAT1 の認識配列が存在しているが、実際に p53 遺伝子を STAT1 は活性化できるのか否か興味深い。また本研究ではマウスの肝細胞で p53 mRNA の発現を確認しているためマウスの p53 遺伝子の上流にも認識配列は存在しているの確認する必要がある。
- ・ IRF-1 については RT-PCR のレベルではあるが、IFN- γ によって肝細胞内に誘導されることは既に確認した。実際にIFN- γ によって誘導される肝細胞死、あるいは DNA 合成の阻害に IRF-1 は関与しているか否か興味深い。
- ・ DNA 合成阻害へ p53 は本質的に関与しているのか、またそうだとしたどのようにして DNA 合成をあるいは細胞増殖を阻害しているのだろうか。
- ・ 何らかの ICE 様プロテアーゼが IFN- γ による肝細胞死に関わることが強く示唆されたことから、このプロテアーゼの同定が望まれる。
- ・ プロテアーゼの CPP32 を p53 は本当に制御しているのか、もしそうだとしたらどのような制御であろうか。CPP32/Yama とファミリーを形成している ICE はインターフェロン誘導性転写因子 IRF-1 によって誘導されることが報告されている。IFN- γ による肝細胞障害への二つの転写因子と、これらのICE/CED-3 ファミリーがどのような相互関係あるいは役割分担をして肝細胞障害を誘導しているのか興味深い。
- ・ マウスの肝癌細胞である Hepa1-6 の細胞周期を同調させるなどの方法により、

IFN- γ に対する感受性はもっと高められるのであろうか。また、Hepa 1-6 の DNA 合成は IFN- γ によって阻害されなかったが、p53 は正常型なのか、あるいは p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} は発現しているのか検討の必要があると考えられる。

<最後に>

本研究において初代培養肝細胞は IFN- γ に対して強い感受性を有することが明らかになった。このことの生理的意味と分子機構を明らかにすることが今後における最も重要なテーマであると考えられ、進展に期待したい。

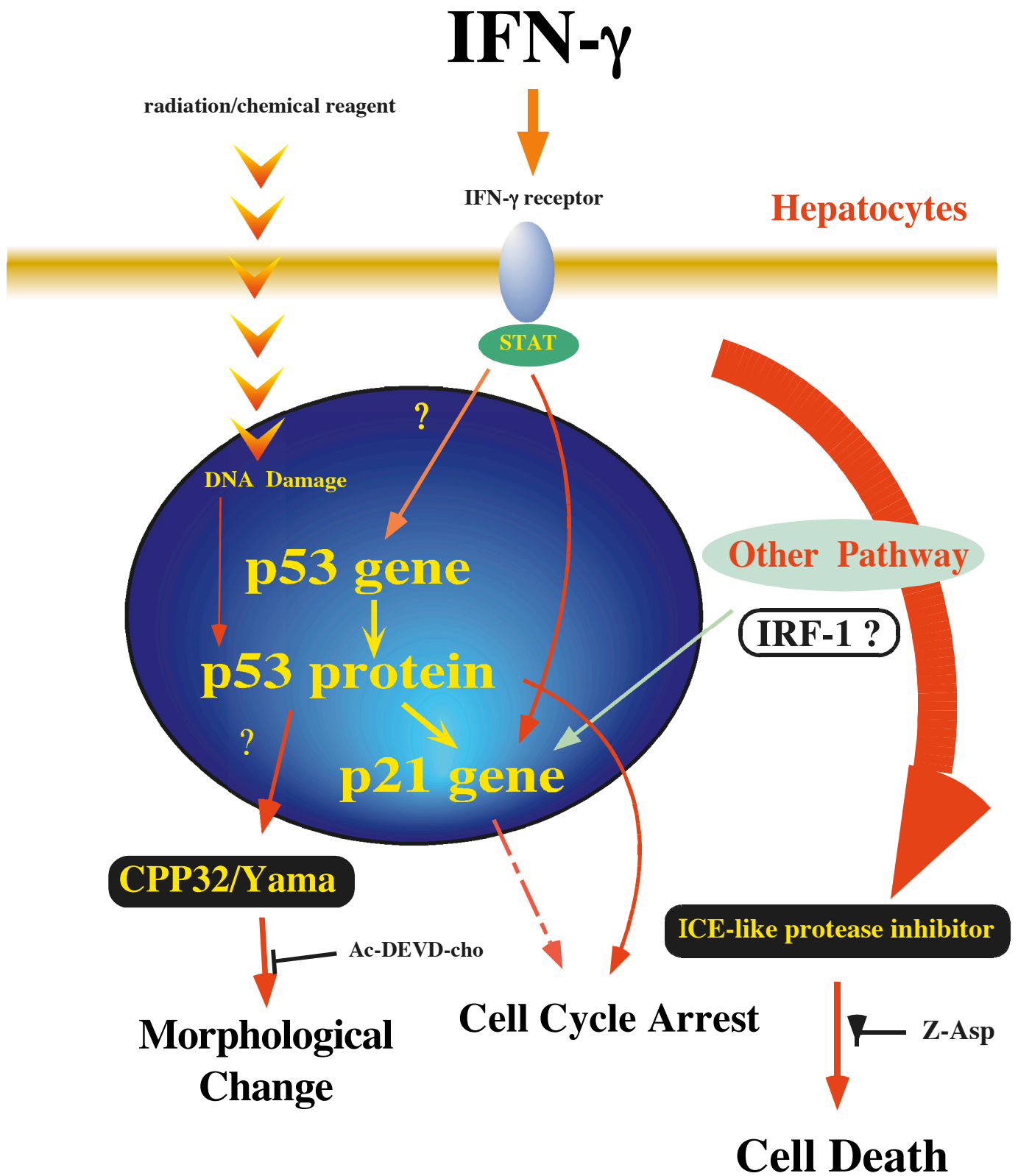


Figure 5.
Mechanism of IFN- γ -induced hepatotoxicity

参考文献

- 1) Alberts, B., et al., (1994) Molecular Biology of The Cell, Garland Publishing, Inc., New York & London
- 2) Arias, I. M., et al., (1994) The Liver : Biology and Pathology, Third Edition, Raven Press, Ltd., New York
- 3) Rehermann B., et al., (1994) Eur. J. of Clin. Invest., 24, 11-19
- 4) Doi, F., et al., (1993) Hepatology, 17, 1086- 1094
- 5) Colucci, G., et al., (1983) Gastroenterology, 85, 1138- 1145
- 6) McClain, C. J., et al., (1989) Hepatology, 9, 349- 351
- 7) Malizia, G., et al., (1991) Gastroenterology, 100, 749- 755
- 8) Montano, L., et al., (1983) Hepatology, 3, 292- 296
- 9) 大沢利昭・小山次郎・奥田研爾・矢田純一, (1993) 免疫学事典、東京化学同人
- 10) 東野一彌・松井聖・上木昇、(1995) 肝胆膵, 31, 25- 34
- 11) 宮園浩平・菅村和夫、(1995) サイトカイン・増殖因子、羊土社
- 12) Isaacs, A., and Lindenmann, (1957) J., Proc. R.Soc. Lond. B Biol. Sci., 147, 258- 267
- 13) Wheelock, E. F., (1965) Science, 149, 310- 311
- 14) Landlfo, S., and Garotta, G., (1991) J. Immunol. Res., 3, 81
- 15) Novelli, F., et al., (1994) J. Immuno., 152, 496- 504
- 16) Maier, J. A. M., Morelli, D., and Balsari, A., (1995) Biochem. Biophys.

Res. Commun., 214, 582- 588

- 17) Deiss, L. P., and Kimchi, A., (1991) Science, 252, 117- 119
- 18) Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M., Varfolomeev, E.,
(1995) Trends Biochem. Sci., 20, 342- 344
- 19) Deiss, L. P., Feinstein, E., Berissi, H., Cohe, O., and Kimchi, A., (1995)
Genes Deve., 9, 15- 30
- 20) Kissil, J. L., Deiss, L. P., Bayewitch, M., Raveh, T., Khaspekov, G., and
Kimchi, A., (1995) J. Biol. Chem., 270, 27932- 27936
- 21) Deiss, L. P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, B., and Kimchi, A., (1996)
EMBO J., 15, 3861- 3870
- 22) Morita, M., Watanabe, Y., Akaike, T., (1995) Hepatology, 21, 1585-
1593
- 23) Wilks, A.F. et al, (1991) Mol. Cell. Biol., 11, 2057- 2065
- 24) Harpur, A. G. et al, (1992) Oncogene, 7, 1347- 1353
- 25) Takahashi, T., and Shirasawa, T., (1994) FEBS lett., 342, 124- 128
- 26) Frimbach, K. I., et al., (1990) Oncogene, 5, 1329- 1336
- 27) Pellegrini, S., et al., (1989) Mol. Cell. Biol., 9, 4605- 4612
- 28) Pellegrini, S., et al., (1993) Trends Biochem. Sci., 18, 338- 342
- 29) Velazquez, L., et al., (1992) Cell, 70, 313- 32 p
- 30) Colamonici, O. R., et al., (1994) J. Biol. Chem., 269, 3518- 3522
- 31) Darnell, J. E. et al. (1994) Science, 264, 1415- 1421
- 32) Muller, M., et al., (1993) EMBO J, 12, 4221- 4228

- 33) Leung, S., et al., (1995) Mol. Cell. Biol., 15, 1312- 1317
- 34) Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. J. E., (1994) Science, 264, 95- 98
- 35) Waltling, D., et al., (1993) Nature, 366, 166- 170
- 36) Swenson, K. I., et al., (1986) Cell, 47, 861- 870
- 37) Dunphy, W. G., et al., (1988) Cell, 54, 423- 431
- 38) Gautier, J., et al., (1988) Cell, 54, 433- 439
- 39) Fang, F., and Newport, J. w. (1991) Cell, 66, 731- 742
- 40) Ninomiya-Tsuji, J., et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9006- 9010
- 41) Matsushime, H., et al., (1992) Cell, 71, 323- 334
- 42) Kato, J. - Y., et al., (1993) Genes Dev., 7, 331- 342
- 43) Baldin, V., et al., (1993) Genes Dev., 7, 812- 821
- 44) Quelle, D. E., et al., (1993) Genes Dev., 7, 1559- 1571
- 45) Koff, A., et al., (1991) Cell, 66, 1217- 1228
- 46) Lew, D. J., et al., (1991) Cell, 66, 1197- 1206
- 47) Ohtsubo, M., and Roberts, J. M., (1993), Science, 259, 1908- 1912
- 48) Resnitsky, D., et al., (1994), Mol. Cell. Biol., 14, 1669- 1679
- 49) Paris, J., et al., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1039- 1043
- 50) Friend, S. H., et al., (1986), Nature, 323, 643- 646
- 51) Whyte, P., et al., (1988) Nature, 334, 124- 129
- 52) 田矢洋一、(1992) 実験医学, 10, 2154- 2158
- 53) 田矢洋一、(1994) 実験医学, 12, 1580- 1586,

- 54) E1-Deiry, W. S., Et al., (1993) Cell, 75, 817- 825
- 55) Harper, J. W., et al., (1993) Cell, 75, 805- 816
- 56) Noda, A., et al., (1994) Exp.Cell Res., 211, 90- 98
- 57) Yonish-Rouach, E. et al., (1991) Nature, 352, 345- 347
- 58) Lane, D. P., (1992) Nature, 358, 15- 16
- 59) Clarke, A. R., et al., (1993) Nature, 362, 849- 852
- 60) Lowe, S. W., et al., (1993) Nature, 362, 847- 849
- 61) White, E., (1994) Nature, 371, 21- 22
- 62) Bursch, W., Taper, H. S., Lauer, B., Schulte-Hermann, R., (1985)
Virchows Arch. B Cell. Pathol. 50, 153- 166
- 63) Fausto, N., (1990) Curr. Opin. Cell Biol., 2, 1036- 1042
- 64) Furlong, R. A., (1992) Bioessays 14, 613- 617, 1992
- 65) Goss, R. J., (1978) The Physiology of Growth, 251- 266, New York :
Academic Press
- 66) Nakamura, T., et al. (1989) Nature, 342, 440- 443
- 68) Richman, R. A., Claus, T. H., Pilakis, S. J., Friedman, D. L., (1976) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, 73, 3589- 3593
- 69) Page D, T., et al., (1979) J. Immunol. Methods, 27, 159- 173
- 70) Tanaka, K., et al., (1978) J. Biochem., 84, 937- 946
- 71) Alpini, G., et al., (1994) Hepatology, 20, 494- 514
- 72) Muir, D., et al., (1990) Anal.Biochem., 185, 377- 382
- 73) Decker T., et al., (1988) J.Immunol. Methods, 115, 61- 69

- 74) Nakamura, T., Tomita, Y., Ichihara, A., (1983) *J. Biochem.*, 94, 1029-1035
- 75) Satoh, M., Yamazaki, M., (1992) *J. Cell. Physiol.*, 150, 134- 139
- 76) Kanzaki, M., You-Qing, Z., Mine, T., Kojima, I., (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202, 422-428
- 77) Tanahashi, T., Suzuki, M., Imamura, T., Mitsui, Y., (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 8221- 8227
- 78) Epstein, C., (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 57, 327- 334
- 79) Tulp, A., Welagen, J. J. M. N., Emmelot, P., (1976) *Biochem. Biophys. Acta*, 451, 567-582
- 80) Cohen, J. J., Duke, R. C., Fadok, V. A., Seins, K. S., (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7, 267-293
- 81) Ellis R. E., et al., (1991), *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7, 663-698
- 82) Hibbs, J. B., Taintor, R. R., and Vavrin, Z. (1987) *Science* 240, 473-476
- 83) Palmer, R. M. J., Ashton, D. S., Moncada, S., (1988) *Nature*, 333, 644-666
- 84) Curran, R. D., Billiar, T. R., Stuehr, D.J., Hofmann, K., and Simmons, R. L. (1989) *J. Exp. Med.* 170, 1769-1774
- 85) Adamson, G. M., and Billings, R. E. (1993) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 119, 100- 107
- 86) Nakano, H., et al., (1987) *J. Antibiotics* 40, 706

- 87) Raju, V. K., et al., (1988) *Molecular Pharmacology*, 33, 537
- 88) Nicks, K. M., et al., (1989) *Cancer Res.*, 49, 5191
- 89) Ellis, R. E., et al., (1991) *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7, 663- 698
- 90) Yuan, J., et al., (1993) *Cell*, 75, 641- 652
- 91) Fernandes- Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S., (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 30761- 30764
- 92) Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., et al., (1995) *Nature*, 376, 37- 43
- 93) Tewari, M., et al., (1995) *Cell*, 81, 801- 809
- 94) Walker, N. P. C., (1994) *Cell*, 78, 343
- 95) Wilson, K. P., et al, (1994) *Nature* 370, 270
- 96) Enari, M., Talanian, R. V., Wong, W. W., and Nagata, S., (1996) *Nature*, 380, 723- 726
- 97) Dolle, R., E., et al., (1994) *J. Med. Chem.*, 37, 563
- 98) Mashima, T., et al, (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 209, 907
- 99) Nakamura, T., Tomita, Y., and Ichihara, A., (1983) *J. Biochem.*, 94 1029- 1035
- 100) Tamula, T., et al., (1995) *Nature*, 376, 596- 598
- 101) Martin, S. J., et al., (1996) *EMBO J.*, 15, 2407- 2416
- 102) Darmon, A. J., Ley, T. J., Nicholson, D. W., Bleackley, R. C., (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 21706- 21712
- 103) Linzer, D. I. H., and Levine, A. J., (1979) *Cell*, 17, 43- 52

- 104) El-Deiry, W. S., et al., (1993) *Cell*, 75, 817- 825
- 105) Harper, J. W., et al., (1993) *Cell*, 75, 805- 816
- 106) Cho, Y. et al., (1994) *Science*, 265, 346- 355
- 107) Clore, G. M., et al., (1994) *Science*, 265, 386- 391
- 108) Kastan, K. B., et al., (1992) *Cell*, 71, 587- 597
- 109) Wu, X., et al., (1993) *Genes & Dev.*, 7, 1126- 1132
- 110) Owen-Schaub, L. B., et al., (1995) *Mol. Cell. Biol.*, 15, 3032- 3040
- 111) Miyashita, T., & Reed, J. C., (1995) *Cell*, 80, 293- 299
- 112) Okamoto, K., & Beach, D., (1994) *EMBO J.*, 13, 4816- 4822
- 113) Johnson, P., et al., (1993) *Mol. Cell. Biol.*, 13, 1456- 1463
- 114) Chiou, S.-K., et al., (1994) *Mol. Cell. Biol.*, 14, 2556- 2563
- 115) Clarke, A. R., et al., (1993) *Nature*, 362, 849- 852
- 116) Lowe, S. W., et al., (1993) *Nature*, 362, 847- 849
- 117) Mosner, J., et al., (1995) *EMBO J.*, 14, 4442- 4449
- 118) Darnell, J. J. E., Kerr, I. M., Stark, G. R., (1994) *Science*, 264, 1415- 1420
- 119) Maki, C. G., Huijbrechtse, J. M., Howley, P. M., (1996) *Cancer Res.*, 56, 2649- 2654
- 120) Chin, Y. E., et al., (1996) *Science*, 272, 719- 722
- 121) Tanaka, N., et al., (1996) *Nature*, 382, 816- 818
- 122) Tsukada, T., et al., (1993) *Oncogene*, 8, 3313- 3322

業績リスト

- 1) Kano, A., Watanabe, Y., Takeda, N., Aizawa, S., Akaike, T.; Analysis of IFN- γ induced cell cycle arrest and cell death in hepatocytes.; J. Biochem., in press
- 2) 狩野有宏、渡辺恵史、赤池敏宏、「IFN- γ によって誘導される肝細胞死の解析」、第 69 回日本生化学会 - 第19 回日本分子生物学会、合同年会、北海道、1996年8月
- 3) Kano, A., Watanabe, Y., Akaike, T.; IFN- γ induces cell death in hepatocytes by upregulating p53.; 6th International Congress on Cell Biology - 36th American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, Dec., 1996

謝辞

本研究は、東京工業大学生体分子工学科生体材料設計講座で行われました。本研究を進めて行くに当たって場所と機会を与えていただき、研究だけにとどまらず幅広くご指導していただいた赤池敏宏教授に感謝いたします。また本講座で学ぶ直接のきっかけを作って下さった信州大学繊維学部機能高分子学科の近藤慶之教授、及び色々アドバイスを下さった同感性工学科の藤井敏弘助教授にこころより感謝いたします。何も分からない私を一から直接ご指導いただいた渡辺恵史助手に深く感謝いたします。幅広い御助言をいただきいろいろ構って下さった丸山厚助手に感謝いたします。

本研究のきっかけを作って下さった森田正彦博士に感謝いたします。本論文を仕上げるに当たり、実際にそして熱心に手伝って下さった、野本陸志さん、伊勢祐彦さんに心より感謝いたします。新しい環境に早くなれるよういつも気遣い、具体的実験のアドバイスはもちろん、最後の学生生活の良い思い出も作ってくれた、武沢竜一さん、新沢康英さん、大崎博功さんに感謝いたします。いつも気を使ってくれた、笹川忠さん、味岡逸樹さん、我妻広貴さんをはじめ赤池研究室の皆さんに感謝します。そして色々お世話になった伊藤京子さん、友尾恵理子さんに感謝いたします。そのほかお世話になった全ての方々に深謝いたします。また、私と人類の知の好奇心を満たしてくれ、おそらく医療の進歩へも少しは貢献したであろうマウスをはじめとする動物達のご冥福をお祈りします。

最後に長い学生生活を経済的、精神的に支えていただき、私のわがままを許して下さい下さった両親に心より感謝いたします。

1997年 3 月

狩野有宏

追記

A. p53 欠損肝細胞の DNA 合成活性に対する IFN- γ の影響

第4章で p53 欠損肝細胞の DNA 合成活性に対する IFN- γ の影響について検討したが、細胞死がすみやかに誘導されてしまうことからはっきりとしたことは言えないものであった。そこで IFN- γ による肝細胞死を阻害した (Figure 2-11) ICE 様プロテアーゼ阻害剤である Z-Asp-CH₂-DCB (Z-Asp) によって細胞死を阻害して DNA 合成を測定した (Figure A)。その結果、IFN- γ による DNA 合成阻害に対し p53 欠損肝細胞は著明に抵抗性を示した。また Z-Asp は野生型肝細胞の DNA 合成にはなんら影響を与えなかった。この結果より p53 が IFN- γ による DNA 合成の停止に重要な役割を担っていることが示された。

B. IRF-1 のノザンブロッティングによる解析

Interferon regulatory factor (IRF-1) はウイルス感染による IFN- β 遺伝子の発現調節に必須なプロモーター領域に結合する転写活性化因子として同定された。IRF-1 が IFN- γ による肝細胞死に関与している可能性については第3、4、5章ですでに述べた。また RT-PCR でも IFN- γ の刺激によって肝細胞内に誘導されていることを観察している。そこでこのことを確認するためにノザンブロッティングを行った (Figure B)。その結果、IFN- γ 刺激 12 時間後にはすでに強く誘導されており、48 時間後でもそれが維持されていた。この結果により肝細胞においても IRF-1 は IFN- γ の刺激によってすみやかに誘導されることが示された。

IRF-1 が IFN- γ による肝細胞障害に関与しているのかどうか興味深い。

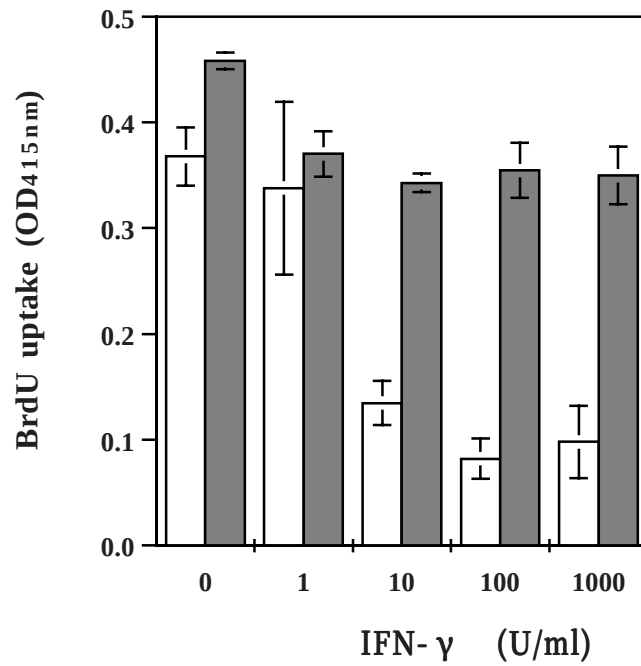


Figure A. Effect of IFN- γ on DNA synthesis of p53-deficient hepatocytes. Hepatocytes were cultured with EGF (10 ng/ml), insulin (100 nM) and serum (5 %). IFN- γ was added at indicated concentration and ICE-like protease inhibitor, Z-Asp-CH₂-DCB was supplemented at 100 μ M. BrdU incorporation between 24 to 48 hrs after stimulation was measured. (Open bars) p53^{+/+}, (shaded bars) p53^{-/-}.

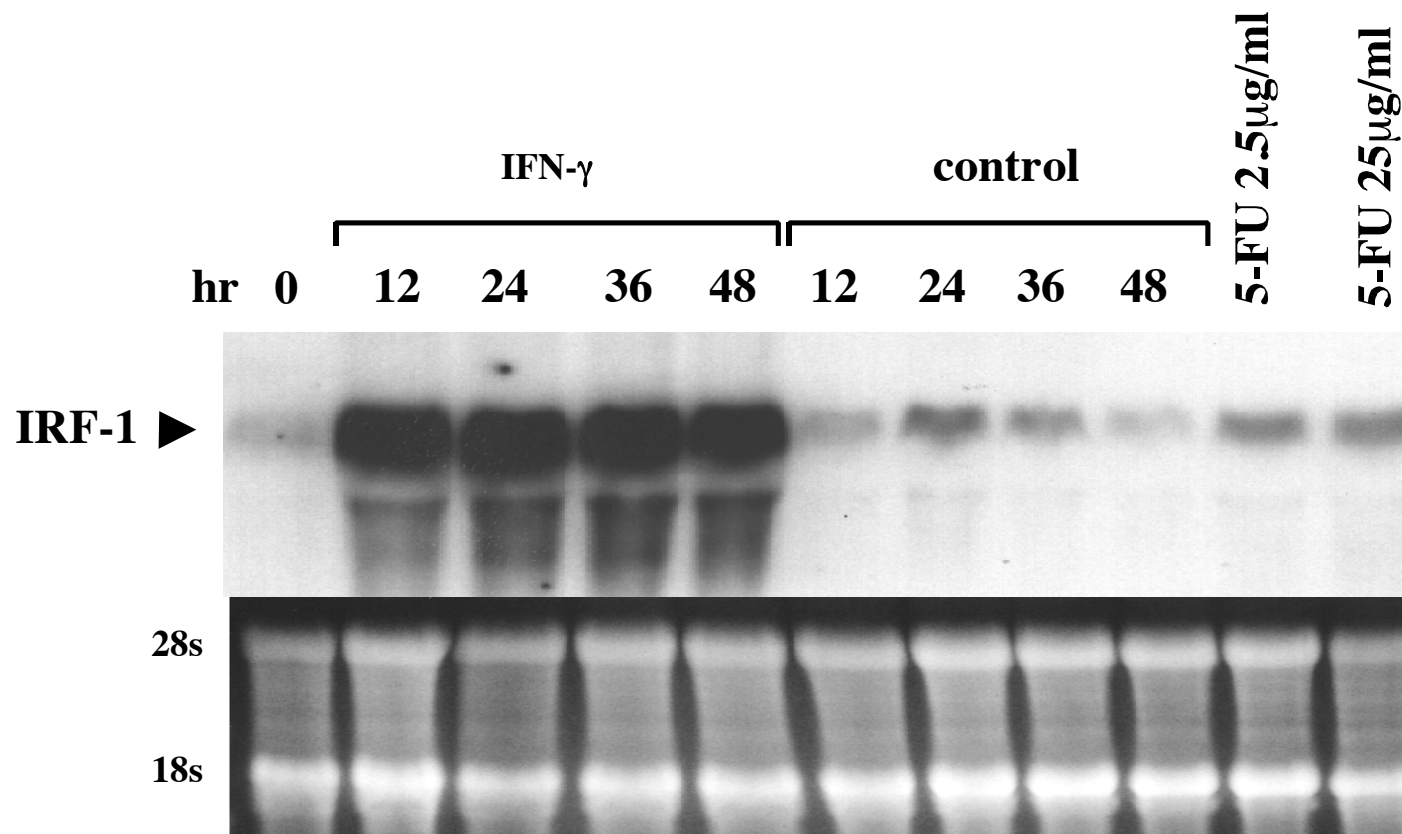


Figure B. Northern analysis of IRF-1 mRNA expression in IFN- γ -treated hepatocytes. Hepatocytes were cultured with IFN- γ (100 U/ml) in the presence of EGF (10 ng/ml), insulin (100 nM) and serum (5 %). The RNAs were extracted at the desired times and subjected to Northern blot analysis.

Hepatitis is an inflammatory liver disease induced by various causes. It is clear that hepatocytes are the major target cells damaged in hepatitis. And it has been reported that many inflammatory cytokines are increased and activated in hepatitis. However, it is not clear what kind of molecules and what kind of regulation are critically involved in the hepatic damage. In this study, the role and mechanisms of IFN- γ , one of the inflammatory cytokines, in hepatotoxicity was examined.

IFN- γ inhibited DNA synthesis of primary cultured mice hepatocytes in a dose-dependent fashion. In addition, IFN- γ induced cell death in hepatocytes after the inhibition of DNA synthesis. The cell death was accompanied by typical apoptotic characters, apoptotic bodies and DNA fragmentation. These data demonstrate that IFN- γ induced cell death is apoptosis. In result of experiment of protein synthesis inhibitor, cycloheximide, it was suggested that de novo protein synthesis within 24 hrs after the addition of IFN- γ was necessary to the cell death.

In recent years ICE and ICE-family proteases are being focused as executable factor of apoptosis. However, the cell death was not influenced by the specific inhibitors of ICE and CPP32. But the inhibitor of CPP32 suppressed the morphological changes accompanying the cell death in a dose-dependent fashion. These results suggest that CPP32-like proteases mediate the morphological changes of IFN- γ -induced cell death in hepatocytes.

Anti-oncogenic factor p53 plays the important role of apoptosis due to DNA damages. Results of examination of p53 indicated that both protein and mRNA were increased in hepatocytes by IFN- γ . In addition, Cdk inhibitor p21, that is known to be transcriptionally increased by p53 protein, was also increased by IFN- γ .

To investigate the substantial roles of p53 induced by IFN- γ , hepatocytes were isolated from p53-deficient mice. As a result, IFN- γ also induced cell death in p53-deficient hepatocytes, however the morphological changes accompanying the cell death were clearly little in p53-deficient hepatocytes compared to wild type. These results indicate that IFN- γ induces p53-independent cell death and p53 induced by IFN- γ mediates the morphological changes accompanying IFN- γ -induced cell death in hepatocytes. In addition, it was clear that p21 mRNA was induced by IFN- γ in hepatocytes through the two pathway that was dependent and independent on p53 protein.

In this study, it was demonstrated that IFN- γ directly induced hepatotoxicity and anti-oncogenic factor p53 was transcriptionally increased in hepatocytes by IFN- γ . In addition, it was indicated that p53 induced by IFN- γ was related to morphological changes accompanying the cell death in hepatocytes.

第1章 「序文」

肝炎や肝硬変は免疫系の異常に起因するものであると考えられ、各種炎症性サイトカインの著明な増加が報告されている。しかしながら、肝実質細胞（肝細胞）の破壊に対する炎症性サイトカインの関与についての詳細は分かっていない。当研究室において検討の結果、IFN- γ が肝細胞に対し障害性を有する知見が得られた。そこで本研究においてはIFN- γ による肝細胞障害機構の解明を目的とした。IFN- γ は、主に生体防御としての機能を担っているといわれ、そのためIFN- γ レセプターはほとんどの細胞に存在していると考えられている。しかし、IFN- γ の活性は多様であり細胞種ごとに大きく異なることから、受け手である細胞の感受性がIFN- γ の活性を規定する要因になっていると考えられる。IFN- γ の細胞障害活性、及び増殖抑制活性に対して感受性を示す細胞の報告は少なく、IFN- γ による初代培養肝細胞の障害機構の解明は極めて重要であると考えられる。

第2章 「初代培養肝細胞の増殖活性、及びIFN- γ によるそのDNA合成の阻害と細胞障害性の解析」

IFN- γ は単独でほぼ完全にマウス初代培養肝細胞のDNA合成を阻害した。さらにフローサイトメトリーによる細胞核のDNA含量の解析の結果、肝細胞はおもに2倍体、4倍体、8倍体で構成されるが、2倍体の肝細胞のDNA合成はIFN- γ によって完全に抑制され、4倍体は2倍体よりも早く核の断片化を起こすことが明らかとなった。この核の断片化はIFN- γ が肝細胞に細胞死を誘導することによるものであり、細胞死の形態的特徴、及び染色体DNAの断片化の観察からアポトーシスと考えられた。そしてIFN- γ はまず肝細胞のDNA合成を抑制し、その後細胞死を誘導するものであることが明らかとなった。また近年アポトーシス実行因子として注目されているプロテアーゼICE、及びCPP32の関与について検討し、CPP32の特異的阻害剤はIFN- γ による肝細胞死を抑制しないにもかかわらず、細胞死にともなう形態的变化を抑制することを見いだした。さらにICE様プロテアーゼ阻害剤によって細胞死が抑制され、他の何らかのICEファミリーが細胞死に関与していることが示唆された。

第3章 「IFN- γ による肝細胞障害における癌抑制因子 p53 の解析」

細胞周期の停止と細胞死に関与する因子として p53 に注目し解析を行った結果、IFN- γ の濃度に依存して p53 が増加することが明らかとなった。さらに、DNA 損傷時に誘導される p53 とは異なり、mRNA の発現も IFN- γ によって誘導されることを見いだした。また細胞周期の停止に関与し、p53 によって転写レベルで誘導されることが知られている Cdk インヒビター p21^{Waf1/Sip1/Sdi1} mRNA は、IFN- γ の刺激により 2 段階で増加することが示された。

インターフェロンの細胞内シグナル伝達と誘導性転写を担うタンパク質 STAT 1 の特異的認識配列がヒト p53 遺伝子上流に存在することを確認したことから、IFN- γ が STAT 1 を介して p53 遺伝子を活性化する可能性が推測された。

第4章 「IFN- γ の p53 欠損肝細胞に対する影響」

p53 アンチセンスオリゴ DNA によって IFN- γ による肝細胞の DNA 合成障害が若干抑制され、ここに p53 が関与していることが示唆された。次に p53 欠損マウスより得た肝細胞を使用して検討を行った。RT-PCR の結果より、野生型よりも約 1.1 kbp 長い増幅バンドとして検出されターゲッティングは確認された。しかしこれは、ターゲッティングされた p53 遺伝子も転写されることを示しており、プロモーター部分がそのまま残っているためではないかと推測される。また p53 欠損肝細胞においても IFN- γ によって細胞死が誘導されることが示され、p53 非依存的な細胞死であることが明らかとなった。しかし、p53 欠損肝細胞は細胞死は誘導されるものの接着伸展形態を維持し、p53 は細胞死にともなう形態変化に関与しているのではないかと推測された。この現象は CPP32 の阻害剤を使用したときにも観察されており、p53 が CPP32 を制御しているのかどうか興味を持たれる。また p53 欠損肝細胞では IFN- γ の刺激による p21 mRNA の後半の誘導がみられないことから p53 に依存した発現であることが明らかとなり、IFN- γ による p21 の誘導は p53 依存型と非依存型の二つの異なるタイプによるものであることが示された。

第5章 「結論」

本研究によって IFN- γ の新しい機能を明らかにし、アポトーシス研究における有効な題材を整えることが出来た。これらの結果は、初代培養肝細胞に注目することによって成し得たと考えられる。この研究で提示することができた肝細胞における IFN- γ のシグナル伝達機構、アポトーシスのメカニズムなどの今後の課題の進展に期待したい。

バイオテクノロジー

炎	症	性	サ	イ	ト	カ	イン	で	ある	IFN- γ	の	マウ
ス	初	代	培	養	肝	細	胞	に	対	す	る	障
害	性	につ	い	て	検	討	し	た	結	果、	IFN- γ	は
肝	細	胞	の	DNA	合	成	を	抑	制	し、	続	い
て	ア	ポ	ト	ー	シ	ス	と	考	え	ら	れ	る
細胞	死	を	誘	導	す	る	こ	と	が	明	ら	か
とな	った。	そ	し	て	近	年	ア	ポ	ト	ー	シ	ス
実行	因子	として	注	目	さ	れ	る	プ	ロ	テ	ア	ー
ゼ	CPP32	に	対	す	る	特	異	的	阻	害	剤	に
よ	っ	て	細胞	死	に	とも	な	う	形	態	変	化
が	抑	制	さ	れ	る	こ	と	が	示	され	た。	さら
に	IFN- γ	は	肝	細	胞	に	癌	抑	制	因	子	と
して	知	られ	る	p53	タ	ン	パ	ク	質	及	び	mRNA
を	誘	導	する	という	事	実	が	見	い	だ	され	た。
p53	欠	損	肝	細	胞	を	使	用	した	検	討	によ
って	IFN- γ	は	p53	非	依	存	的	に	肝	細	胞	死
を	誘	導	する	こ	と	が	明	ら	か	となり、	また	この
p53	は	CPP32	と	同	様	な	形	態	変	化	に	関
与	して	いる	こ	と	が、	示	唆	され	た。			

本論文は「IFN- γ による肝細胞障害機構の解明」と題し、5章より構成される。

第1章 「序文」では肝臓及び肝臓の主要な疾患である肝炎とそれに関わるサイトカインについて概説している。また炎症性サイトカインの一つであるIFN- γ の役割と重要性についてふれ、細胞の増殖と細胞死に焦点を置いた肝細胞の細胞生物学的研究の意義とこの研究の目的について記している。

第2章 「初代培養肝細胞の増殖活性、及びIFN- γ によるそのDNA合成の阻害と細胞障害性の解析」でははじめにマウス初代培養肝細胞の増殖活性について解析し、その増殖活性はIFN- γ 単独でほぼ完全に阻害されることをDNA合成を指標に示している。さらにフローサイトメトリーによる細胞核のDNA含量の解析により、肝細胞はおもに2倍体、4倍体、8倍体で構成され、4倍体が約60%を占めていることを示し、2倍体の肝細胞のDNA合成はIFN- γ によって完全に抑制され、4倍体は2倍体よりも早く核の断片化を起こすことを明らかにしている。この核の断片化はIFN- γ が肝細胞に細胞死を誘導することによるものであり、この細胞死の形態的特徴、及び電気泳動による染色体DNAの断片化の観察から、アポトーシスと考えられることを示している。そしてIFN- γ による肝細胞障害の作用機序はまず肝細胞のDNA合成を抑制し、その後細胞死を誘導するものであることを明らかにしている。また近年アポトーシス実行因子として注目されているプロテアーゼ ICE、及びCPP32の関与について検討し、CPP32の特異的阻害剤はIFN- γ による肝細胞死を抑制しないにもかかわらず、細胞死にともなう形態的变化を濃度依存的に抑制することを見いだしている。

第3章 「IFN- γ による肝細胞障害における癌抑制因子p53の解析」ではIFN- γ による肝細胞障害の作用機序がDNA損傷性の障害と似ていることに言及し、DNA損傷性の障害では癌抑制因子であるp53が重要な役割を担っていることが報告されていることから、IFN- γ で刺激した肝細胞についてもp53に注目し解析を行っている。その結果、IFN- γ の濃度に依存して肝細胞内のp53が増加することを明らかにし、核内でも増加していることを示している。そしてさらに、p53をノザンブロッティングによって評価し、DNA損傷時に誘導されるp53とは異な

り、mRNAの発現もIFN- γ によって誘導されることを見いだしている。また、細胞周期の停止に関与し、p53によって転写レベルで誘導されることが知られているCdk インヒビター p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}についても検討し、IFN- γ で刺激することによってp21 mRNAは二段階で増加することを明らかにし、後半に増加するp21はp53依存的に誘導されるものであろうと推測している。

STAT1はインターフェロンの細胞内シグナル伝達と誘導性転写を担うタンパク質であるが、ヒトp53遺伝子上流にSTAT1の転写因子としての特異的認識配列が4つそれぞれの近傍に存在することから、IFN- γ がSTAT1を介してp53 遺伝子を活性化する可能性を推測している。

第4章 「IFN- γ のp53欠損肝細胞に対する影響」ではIFN- γ による肝細胞のDNA合成の阻害と、細胞死の誘導にp53が関与しているかどうかをアンチセンスオリゴDNAを使用する方法と、p53欠損肝細胞を使用する方法によって検討している。p53のアンチセンスオリゴDNAによってIFN- γ による肝細胞のDNA合成の阻害が若干抑制されることが示し、ここにp53が関与しているかもしれないとしているが、アンチセンスオリゴDNAによって得られた結果の評価は慎重に行う必要があると述べている。p53欠損マウスより得た肝細胞のRT-PCRによってp53 遺伝子のターゲッティングを確認し、野生型よりも約1.1kbp長い増幅バンドとして検出している。この結果によりターゲッティングは確認されたが、その遺伝子もIFN- γ によって転写されることを示しており、これはプロモーター部分がそのまま残っているためではないかと推測している。p53欠損肝細胞においてもIFN- γ によって細胞死が誘導されることから、IFN- γ による肝細胞死はp53に非依存的な細胞死であることを明らかにしている。しかし、p53欠損肝細胞ではIFN- γ によって細胞死は誘導されるものの接着伸展形態を維持していたことから、p53は細胞死にともなう形態変化に関与しているのではないかと推測している。さらにこの現象はCPP32の阻害剤を使用したときにも観察されていることから、p53がCPP32を制御している可能性について論じている。またp53欠損肝細胞ではIFN- γ の刺激によるp21^{Waf1/Cip1/Sdi1} mRNAの後半の誘導がみられなくなることから、第四章で推測したとうり、後半の誘導はp53に依存するものであることを明らかとし、IFN- γ によるp21の誘導はp53依存型と非依存型の二つの異なるタイプによるものであることを示している。

第5章「結論」では本研究で得られた結果を要約するとともに今後の課題を示している。

これを要するに、本論文は肝炎時に増加することが知られているIFN- γ が単独で、かつ直接的に肝細胞のDNA合成を阻害し、その後細胞死を誘導することを明らかにするとともに、IFN- γ は肝細胞内に癌抑制因子として知られるp53、及びそのmRNAを増加させることを見だし、p53が細胞死にともなう形態変化に関与することを示唆する結果を示したものであり、工学上ならびに工業上貢献するところが大きい。よって本論文は博士（工学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。