

学位論文題名

肝炎・肝癌自然発症 LEC ラットにおける  
グルタチオンペルオキシダーゼの発現に関する研究

学位論文内容の要旨

背景および目的

肝炎・肝癌自然発症 LEC ラットでは Wilson 病の原因遺伝子である *ATP7B* のラット・ホモログ (*atp7b*) に変異が見い出されている。その結果、肝臓で銅が異常蓄積することにより肝炎を発症すると考えられている。しかし Wilson 病患者には肝癌の発生が少ないのに対し、LEC ラットでは肝癌が高頻度に発生することから、LEC ラットには肝癌を発生しやすい遺伝的背景があると考えられる。

細胞型グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx1, EC1.11.1.9) は過酸化水素などの活性酸素を消去してヒドロキシルラジカルの産生を抑制する。グルタチオンペルオキシダーゼ活性は、肝の化学発癌過程で低下することが実験的に証明されており、LEC ラットでは肝臓特異的にこの酵素の活性や mRNA 発現量の低いことが知られている。従って、LEC ラット肝におけるグルタチオンペルオキシダーゼ活性の低下機序の解明は、肝癌の発生・悪性進展の機序を解明する上で有意義な情報を提供すると考えて本研究を行った。

材料および方法

1. 動物：雄性 LEC ラットならびに肝炎・肝癌を発症しない対照の雄性 LEA ラットを用いた。この他 LEA ラットに LEC ラットの *atp-7b* 変異を導入した *atp-7b*<sup>LEC</sup> コンジェニック LEA ラットと *p53* 欠損マウスを用いた。
2. 細胞：LEC ラットと LEA ラットの肝細胞を SV40 large T 抗原で不死化した 93C13 細胞ならびに 93A16 細胞を用いた。その他ラット肝癌細胞 OWH 細胞とヒトグリオーマ細胞 LN-Z308 細胞を用いた。
3. グルタチオンペルオキシダーゼ量の測定：ウサギ抗グルタチオンペルオキシダーゼ抗体を用いて、サンドイッチ ELISA 法にて測定を行った。
4. グルタチオンペルオキシダーゼ活性の測定：Beutler の方法に従った。
5. ラットグルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子 (*GPx1*) の 5'-フランキンク領域ならびに cDNA のクローニング：*GPx1* の 5'-フランキンク領域は Sprague-Dowley ラット肝臓 genomic ライブラリーのスクリーニングを行い、得られたクローンの塩基配列を決定した。LEC ならびに LEA ラットの *GPx1* の 5'-フランキンク領域と cDNA は PCR 法によって増幅し、得られた断片の塩基配列を決定した。
6. ベクター：ルシフェラーゼアッセイ用のベクターにはラット *GPx1* 5'-フランキンク

ング領域とルシフェラーゼ遺伝子のキメラベクター、ならびにNF- $\kappa$ B結合配列を持つエンハンサー活性用ベクターを用いた。p53結合領域を持つルシフェラーゼアッセイ用ベクターには、p21 (WAF1/CIP1)遺伝子のp53結合配列を含むプロモーターの下流にポリオーマプロモーターとTATAボックスを含むPG13PyLucと、Bax遺伝子のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだpMO 23を用いた。p53発現誘導システムには亜鉛誘導型p53発現ベクターを用いた。

7. TAT-p53融合蛋白質：大腸菌に発現させ精製されたもので、細胞内に野生型p53ならびに変異型p53 (コドン248: Arg→Gln) 蛋白質を導入するため用いた。

8. ルシフェラーゼアッセイ：ルシフェラーゼアッセイ用のベクターをトランスフェクトして24時間後各種の薬剤を添加し、一定時間後cell lysateを調製してルシフェラーゼ活性を測定した。

### 結果と考察

atp-7b<sup>LEC</sup>コンジェニックLEAラット肝では正常LEAラット肝と同程度のグルタチオンペルオキシダーゼ活性を示したことから、LECラット肝で認められたグルタチオンペルオキシダーゼ含量の低下が銅の異常蓄積と連鎖しない独立した現象であることが証明された。そこでLECラットのグルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子(GPx1)のcDNAとGPx1転写調節領域について塩基配列の変異の有無を解析したが、変異は認められなかった。したがってLECラットでは、転写因子に異常があると考えられた。ラットGPx1プロモーター領域には、-202から-175にはp53結合配列に類似した配列 (GP1配列) が見いだされた。実際p53欠損マウスでは肝臓においてのみ、グルタチオンペルオキシダーゼ活性の低下が認められた。またOWH肝癌細胞でのp53発現誘導およびLN-Z308グリオーマ細胞へのp53蛋白質導入実験では、GPx1プロモーターの活性化が認められた。これらの結果よりGPx1遺伝子の転写活性にp53が関与している可能性が高いと考えられた。そこでLECラットとLEAラット肝の性質を反映していると考えられる93C13細胞と93A16細胞を用いて、GPx1プロモーター活性の測定を行った。これらの細胞に抗癌剤エトポシドでp53を誘導してp21 (WAF1/CIP1)遺伝子のプロモーターを持つPG13PyLucでルシフェラーゼ・アッセイを行った実験では、両細胞株ともp21の転写活性が上昇した。これに対し、GPx1プロモーターはエトポシドにより93A16細胞は活性上昇を示したが、93C13細胞は無反応であった。したがって、93C13細胞ではp53によるGPx1プロモーターの活性化に必要なco-factorが欠如しているのではないかと考えられた。同様に、NF- $\kappa$ B結合配列を持つエンハンサー活性用ベクターでルシフェラーゼアッセイを行うと、93A16細胞ではTNF- $\alpha$ によりルシフェラーゼ活性の上昇が認められたが、93C13細胞ではほとんどルシフェラーゼ活性は上昇しなかった。これらの結果から、LEC由来の93C13細胞ではp53およびNF- $\kappa$ Bと協調する因子が不足していることが予測された。そこでGPx1プロモーターの各種欠失変異体を作製してルシフェラーゼアッセイを行うと、ルシフェラーゼ活性はGP1配列を欠失させても低下しなかった。また93C13細胞における転写活性は常に93A16細胞における転写活性より低く、いずれの欠失変異体でもその比は同じであった。以上より、LECラット肝由来細胞においては、グルタチオンペルオキシダーゼの発現低下は特異的転写因子の差ではなく、基本転写因子を含む

転写複合体に異常があるためエンハンサー効果が発揮されないことに因ると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 守内 哲也  
副査 教授 細川 眞澄男  
副査 教授 有川 二郎

学位論文題名

## 肝炎・肝癌自然発症 LEC ラットにおける グルタチオンペルオキシダーゼの発現に関する研究

肝炎・肝癌自然発症 LEC ラットでは Wilson 病の原因遺伝子である *ATP7B* のラット・ホモログ (*atp7b*) に変異が見い出されている。その結果、肝臓で銅が異常蓄積することにより肝炎を発症すると考えられている。しかし Wilson 病患者には肝癌の発生が少ないのに対し、LEC ラットでは肝癌が高頻度に発生することから、LEC ラットには肝癌を発生しやすい遺伝的背景があると考えられる。

細胞型グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx1, EC1.11.1.9) は過酸化水素などの活性酸素を消去してヒドロキシルラジカルの産生を抑制する。グルタチオンペルオキシダーゼ活性は、肝の化学発癌過程で低下することが実験的に証明されており、LEC ラットでは肝臓特異的にこの酵素の活性や mRNA 発現量の低いことが知られている。申請者は LEC ラット肝におけるグルタチオンペルオキシダーゼ活性の低下機序の解明は、肝癌の発生・悪性進展の機序を解明する上で有意義な情報を提供すると考えて本研究を行った。LEC ラットの *atp-7b* 遺伝子変異を持つ *atp-7b*<sup>LEC</sup> コンジェニック LEA ラット肝では正常 LEA ラット肝と同程度のグルタチオンペルオキシダーゼ活性を示したことから、LEC ラット肝で認められたグルタチオンペルオキシダーゼ含量の低下が銅の異常蓄積と連鎖しない独立した現象であることが証明された。そこで LEC ラットのグルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子 (*GPx1*) の cDNA と *GPx1* 転写調節領域について塩基配列の変異の有無を解析したが変異は認められなかった。したがって LEC ラットでは、転写因子に異常があると考えられた。ラット *GPx1* プロモーター領域には、転写開始点から 175-202 塩基上流に p53 結合配列に類似した配列 (GP1 配列) が見いだされた。実際 p53 欠損マウスでは肝臓においてのみ、グルタチオンペルオキシダーゼ活性の低下が認められた。また OWH 肝癌細胞での p53 発現誘導および LN-Z308 グリオーマ細胞への p53

蛋白導入実験では、GPx1プロモーターの活性化が認められた。これらの結果よりGPx1遺伝子の転写活性にp53が関与している可能性が高いと考えられた。そこでLECラットとLEAラット肝の性質を反映していると考えられる93C13細胞（LEC由来）と93A16細胞（LEA由来）を用いて、GPx1プロモーター活性の測定を行った。これらの細胞に抗癌剤エトポシドでp53を誘導してp21（WAF1/CIP1）遺伝子のプロモーターを持つPG13 PyLucでルシフェラーゼ・アッセイを行った実験では、両細胞株ともp21の転写活性が上昇した。これに対し、GPx1プロモーターはエトポシドにより93A16細胞は活性上昇を示したが、93C13細胞は無反応であった。したがって、93C13細胞ではp53によるGPx1プロモーターの活性化に必要なco-factorが欠如しているのではないかと考えられた。同様に、NF- $\kappa$ B結合配列を持つエンハンサー活性用ベクターでルシフェラーゼアッセイを行うと、93A16細胞ではTNF- $\alpha$ によりルシフェラーゼ活性の上昇が認められたが、93C13細胞ではほとんどルシフェラーゼ活性は上昇しなかった。これらの結果から、LEC由来の93C13細胞ではp53およびNF- $\kappa$ Bと協調する因子が不足していることが予測された。そこでGPx1プロモーターの各種欠失変異体を作製してルシフェラーゼアッセイを行うと、ルシフェラーゼ活性はGP1配列を欠損させても低下しなかった。また93C13細胞における転写活性は常に93A16細胞における転写活性より低く、いずれの欠失変異体でもその比は同じであった。以上より、LECラット肝由来細胞においては、グルタチオンペルオキシダーゼの発現低下は特異的転写因子の差ではなく、基本転写因子を含む転写複合体に異常があるためエンハンサー効果が発揮されないことに因ると考えられた。

公開発表に際し、副査の細川教授よりLECラット肝における発癌率、またNF- $\kappa$ Bの変異の有無について質問があった。続いて副査の有川教授よりLECラット肝における銅の蓄積とGPx1活性の低下が肝癌発症と関与があるか質問を受けた。最後に主査の守内教授よりLECラットの種々の異常をプロモーターの伝達異常という点から説明可能であるかについて質問を受けた。申請者は各質問に対して、概ね適切に回答した。

本研究はLECラット肝由来細胞における転写活性の異常は特異的転写因子の異常ではなく、プロモーターの種類に特異的であることを発見した点で高く評価され、LECラットで認められる多くの異常を一元的に説明できる可能性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や所得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。