

Title	発癌プロモーターにより肝癌細胞から分泌される蛋白質のc-myc 遺伝子による調節
Author(s)	三輪谷, 博史
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36050">https://hdl.handle.net/11094/36050</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【18】

氏名・(本籍)	みわたにひろし 三輪谷博史
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8588 号
学位授与の日付	平成元年3月24日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	発癌プロモーターにより肝癌細胞から分泌される蛋白質の c-myc 遺伝子による調節
論文審査委員	(主査) 教授 内田 駿 (副査) 教授 岡田 善雄 教授 上田 重晴

論文内容の要旨

〔目的〕

人肝芽腫細胞 (Huh-6 Cl-5) に発癌プロモーターを作用させると、p46 (分子量4万6千, pI 7.1 ~ 7.3 の蛋白質) が培養上清中に誘導される。発癌プロモーターのこの作用を人肝癌細胞 (Huh-7 Cl-4) においてさらに詳しく解析し、さらに発癌遺伝子 (c-myc 及び c-Ha-ras) とこの現象に関係があるかどうかを明らかにするために本実験をおこなった。

〔方法ならびに成績〕

人肝芽腫細胞 (Huh-6 Cl-5) に発癌プロモーターを作用させると分子量4万6千で三つの等電点 (pI 7.1, 7.2, 7.3) を持つ蛋白質 (以下p46と云う) が培養上清中に分泌されることが知られている。この現象が別の分化型肝由来細胞でも認められるかを明らかにするために、人肝癌細胞 (Huh-7 Cl-4) に発癌プロモーターの一種であるTPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate) を作用させて、SDS-PAGE で培養上清を解析した。その結果分子量4万6千の蛋白質が誘導された。この蛋白質がp46であることを明らかにするため二次元電気泳動を試みた。そしてこの蛋白質が三つの等電点 (pI 7.1, 7.2, 7.3) を持つことより、この蛋白質がp46であると結論した。またこのとき、人肝癌細胞はTPAを作用させなくてもわずかにp46を分泌していることもわかった。一般にTPAは、細胞増殖に関係していると云われているC-kinase (calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase) を活性化させるので、この細胞の蒔き込み数をかえてその培養上清をSDS-PAGE で解析した。すると人肝癌細胞において低密度で細胞を蒔いたとき、その培養上清中に高密度で細胞を蒔いたときと比べてp46の分泌量が増加しているのを認めた。このことよりp46の分泌と人肝癌細胞の増殖

とに関係があると示唆された。近年 competence proto-oncogene c-myc は細胞増殖を調節すると云われている。そのため私は人肝癌細胞に c-myc 遺伝子を導入した。その結果 c-myc 遺伝子を導入した全ての人肝癌細胞において p46 の分泌の増加を認めた。一方対照として c-myc 遺伝子の代わりに同じベクターに組み込まれた c-Ha-ras 遺伝子を導入した人肝癌細胞においては、p46 の明らかな分泌の増加は認められなかった。さらに詳しく p46 の分泌と c-myc 遺伝子との関係を調べるために、各々の状態の細胞より poly(A) RNA を抽出して RNA ブロッキング法で解析した。その結果 p46 の分泌量と対応する c-myc の mRNA の発現量を認めた。以上の結果より、私は本論文にて p46 の分泌が c-myc の発現によって調節されていることを示した。p46 の生理的役割はまだ明らかにされていない。しかし p46 は抗人全血清抗体で免疫沈降反応を示さない。また p46 の分子量に近似な  $\alpha$ 1-アシッドグリコпротеインや  $\alpha$ 1-アンチトリプシンなどの抗体でも免疫沈降反応を示さないことより、正常血清蛋白ではないと考えられている。また p46 の分泌はアクチノマイシン D によって阻害されることより、TPA によって新たに誘導されると考えられている。本論文では、さらに、用いた二種類の細胞により p46 の三つのアイソフォームでその分泌量が異なることを示した。近年 c-myc 遺伝子について多くの知見が蓄積されている。そのなかに培養細胞での c-myc 遺伝子の過剰発現は細胞にとって毒性があるといわれているので、そのことについて考察した。また、肝再生の初期や肝炎ウイルスにより引き起こされた肝癌において c-myc 遺伝子の活性化が認められるとの報告がある。そこで、肝再生や肝炎、肝硬変、肝癌などのフォローアップにおける p46 の臨床医学的応用の可能性に対して考察した。

〔総括〕

私は本論文で、①発癌プロモーターが p46 を別の分化型肝癌細胞 (Huh-7 C1-4) においても誘導することを示した。②この現象が発癌遺伝子 c-myc により調節されていることを示した。③ p46 のアイソフォームの割合が二つの細胞で異なっていることを示した。

## 論文の審査結果の要旨

c-myc 遺伝子の異常発現が引き起こす細胞変化について、形態学的解析はしばしば行なわれているが、本研究は蛋白レベルで解析したものである。本研究は、発癌プロモーターにより肝癌細胞から分泌される蛋白質が c-myc 遺伝子により調節されていることを示している。本研究を進めることにより、今まで明らかではなかった c-myc 遺伝子の直接の作用が明らかにされる可能性がある。そのため本研究に対して医学博士の学位を授与するに値すると認める。